

**Laura Cabanillas Vega**  
**Madrid, 2015**

Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Microbiología

# **CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A 5-AZACITIDINA EN EL BACTERIÓFAGO Q $\beta$**

**TESIS DOCTORAL**

**Autora**

Laura Cabanillas Vega

**Directora de tesis**

Dra. Ester Lázaro Lázaro

**Madrid, Junio 2015**

Memoria presentada por la licenciada en Biología Laura Cabanillas Vega para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, Junio de 2015.

El trabajo realizado en esta tesis doctoral se ha llevado a cabo en el Laboratorio de Evolución Molecular del Centro de Astrobiología (CAB), bajo la dirección de la Doctora Ester Lázaro y financiado por una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) del Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial – Esteban Terradas (INTA).

*A mi familia*

*En el cajón de la memoria  
guardo trocitos de la historia,  
las páginas que ya han pasado  
y un libro inacabado...*

Cigarrito  
Platero y tú

## AGRADECIMIENTOS

Esto ha llegado a su fin. Han sido cuatro años, bueno, casi cinco, de pasar muy buenos momentos, de otros no tan buenos, y algunos otros que solo se arreglaban con una cerveza y un montadito. A mis “CABeros” favoritos (los guays, claro), os agradezco mucho todos estos años de amistad, los ratos que hemos pasado tanto dentro como fuera del CAB. Ya no quedamos ninguno por allí pero... ¡¡¡hemos conseguido sobrevivir!!! Por muchos años más de amistad, aunque eso sí, ahora como Ex-CABeros!

Agradezco al Dr. Carlos Briones y a su grupo de investigación toda la ayuda y el apoyo recibido en estos años. Miguel, María, ni con mil gracias bastaría para que supierais lo que me habéis aportado en estos años. Sabéis que os recordaré toda la vida. María, vaya donde vaya me acordaré de ti, porque le das alegría al laboratorio, y porque hasta he llegado a echar de menos tus canciones!! Miguel, por toda tu ayuda durante estos años, en los momentos en los que necesitaba de alguien que me echara un cable, por compartir conmigo tu sabiduría, y por supuesto, por tu música (la buena claro...). Me acordaré siempre de todos los buenos ratos que hemos pasado en el laboratorio. Habrá que bajar a desayunar para celebrarlo, ¿no?

A mis amigos, en especial a mi amiga Laura, por todos los momentos en los que nos hemos apoyado la una a la otra en estos cuatro años. Albita querida ¡LO CONSEGUIMOS!

A mi familia, mis padres y mis hermanos, bueno y a Sebas, que ya eres familia de verdad. Gracias a todos por haberme escuchado, comprendido y aconsejado a lo largo de todos estos años.

A Fran, por todo. Empieza una nueva etapa.

Agradezco especialmente a la Dra. Susanna Manrubia el haber podido realizar la Tesis Doctoral dentro de su proyecto de investigación. También agradezco a todas aquellas personas que han formado y forman parte del grupo de seminarios sobre virus y evolución del CAB, CBMSO, ISCIII y UCM, gracias a los cuales he aprendido muchísimo, y sé que seguiré aprendiendo. Agradezco al Dr. Rafael Sanjuán y a MariaNoel Pereira la colaboración y la ayuda recibida durante la recta final de mi investigación. También agradezco al Dr. José Antonio López Guerrero la posibilidad de presentar esta Tesis Doctoral bajo su tutoría y que me proporcionase el contacto con la Dra. Ester Lázaro allá por el año 2010, cuando comencé mis andaduras en esto de la virología.

No podría terminar de mejor forma que dedicando las últimas líneas para agradecer todos los años de tutela de la Dra. Ester Lázaro. Gracias por darme la oportunidad de hacer la tesis en tu laboratorio, por darme tan buenos consejos, por tus explicaciones y correcciones, por tu paciencia en los momentos en los que cometía errores, pero también por las veces en las que has sido exigente conmigo, porque eso ha hecho que me esforzase más cada día.

Gracias.

## Abreviaturas

5-azaCTP	5-azacitidina trifosfato
5-azadCTP	5-aza-2'-deoxicitidina trifosfato
5-FU	5-fluorouracilo
A	Adenina
A <sub>1</sub>	Proteína <i>readthrough</i> de Q $\beta$
A <sub>2</sub>	Proteína de maduración de Q $\beta$
Ad	Adenosina
Agua DEPC	Agua tratada con dietilpirocarbonato
AMV-RT	<i>Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase</i>
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
AZC	5-azacitidina
C	Citosina
C-terminal	Carboxilo terminal
CVB3	<i>Coxsackievirus</i> B3
Cy	Citidina
dAZC	5-aza-2'-deoxicitidina
D.O.	Densidad óptica
dNTP	2'-desoxinucleosido-5'-trifosfato
DpnI	<i>Diplococcus pneumoniae</i> G41
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	Tampon de elución (Elution Buffer)
EDTA	Etilen diamino tetraacetato
EHF	<i>Expand High Fidelity</i>
FdUDP	5-fluorodeoxiuridina-5'-difosfato
Fm	Frecuencia de mutación máxima
FUDP	5-fluorouridina-5'-difosfato
FUMP	5-fluorouridina-5'-monofosfato
FUTP	5-fluorouridina-5'-trifosfato
G	Guanina
Gu	Guanosina
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
IMPDH	Inosín-monofosfato deshidrogenasa
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido
Kb	kilobase
LB	Luria-Bertani
LCMV	Virus de la coriomeningitis linfocitaria
Mb	Megabase
MuLV	Virus de la Leucemia Murina
NB	<i>Nutrient-Broth</i>
N-terminal	Amino terminal
P/V	Peso/Volumen
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
Pb	Pares de bases
PEG	Polietilenglicol
Rib	Ribavirina
RMP	Ribavirina-5'-monofosfato
Rpm	Revoluciones por minuto
RR	Ribonucleótido Reductasa



RT	Retrotranscriptasa
RTP	Ribavirina-5'-trifosfato
SAH	S-adenosil-L-homocisteína
SCM	Síntesis de la cadena mutante
SDS	Dodecil sulfato sódico
s/n/r	Sustituciones por nucleótido y ronda de replicación
SOC	<i>Super Optimal Broth</i> con Represión Catabólica
T	Timina
TAE 10X	Tris-acetato-EDTA 10X
TC	Tampón de carga
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
TRIS-HCl	Tris-clorhídrico
U	Uracilo
UCK	Uridina-citidina Kinasa
Ufp	Unidades formadoras de placas
Ur	Uridina
UV	Ultra Violeta
VFA	Virus de la Fiebre Aftosa
VG	Virus del grabado del Tabaco
VHC	Virus de la Hepatitis C
VIH-1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1
Vol.	Volumen
VSV	Virus de la Estomatitis Vesicular
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

**Términos, acrónimos o abreviaturas fijados en la terminología científica anglosajona que se utilizan indistintamente en castellano**

cDNA	Ácido desoxirribonucleósido copia
<i>Cluster</i>	Grupo
DNA	Ácido desoxirribonucleósido
EF	<i>Elongation Factor</i> (Factor de elongación de la traducción)
<i>Finger domain</i>	Dominio “dedo”
<i>Fitness</i>	Eficacia biológica
Hfr	<i>High Frequency of Recombination</i> (Alta frecuencia de recombinación)
moi	<i>Multiplicity of Infection</i> (Multiplicidad de Infección)
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
<i>Palm domain</i>	Dominio “palma”
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
<i>Pellet</i>	Sedimento
RdRp	RNA polimerasas dependientes de RNA
RF	<i>Release Factor</i> (Factor de liberación de la traducción)
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Retro transcripción y PCR
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
<i>stock</i>	Reserva
ssRNA	Ácido ribonucleico de cadena sencilla
<i>Thumb domain</i>	Dominio “pulgar”
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
wt	<i>Wild Type</i> (Tipo salvaje)

### Formulas químicas

$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	Acetato de amonio
$\text{CHCl}_3$	Cloroformo
$\text{EtOH}$	Etanol
$\text{HNO}_2$	Ácido nitroso
$\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	Acetato de magnesio
$\text{MgCl}_2$	Cloruro de magnesio
$\text{NaCl}$	Cloruro sódico

### Códigos de una y tres letras de los aminoácidos

Acido aspártico	Asp, D	Fenilalanina	Phe, F
Acido glutámico	Glu, E	Leucina	Leu, L
Alanina	Ala, A	Lisina	Lys, K
Arginina	Arg, R	Metionina	Met, M
Asparagina	Asn, N	Prolina	Pro, P
Cisteína	Cys, C	Serina	Ser, S
Glicina	Gly, G	Tirosina	Tyr, Y
Glutamina	Gln, Q	Treonina	Thr, T
Histidina	His, H	Triptófano	Trp, W
Isoleucina	Ile, I	Valina	Val, V

# ÍNDICE GENERAL

<b>1.- Summary (Resumen en inglés)</b>	<b>1</b>
<b>2.- Introducción</b>	<b>3</b>
2.1.- Variabilidad genética de los virus RNA	3
2.2.- Estructura de las poblaciones de virus RNA	4
2.2.1.- Concepto de eficacia biológica	4
2.2.2.- Concepto de cuasiespecie viral	6
2.2.3.- Interacciones en el espectro de mutantes	7
2.3.- Las cuasiespecies como sistemas adaptativos	8
2.3.1.- Factores que influyen en la evolución de las poblaciones virales	9
2.4.- Evolución de los virus RNA a tasa de error incrementada	12
2.5.- Selección de mutantes virales en presencia de análogos de nucleósidos mutagénicos	14
2.6.- Análogos de nucleósidos mutagénicos	16
2.6.1.- AZC	16
2.6.1.1.- Metabolismo del AZC	17
2.6.1.2.- Mecanismo de acción del AZC	19
2.6.2.- Ribavirina y 5-FU	21
2.6.2.1.- Metabolismo de la ribavirina y el 5-FU	21
2.6.2.2.- Mecanismo de acción de la ribavirina y el 5-FU	22
2.7.- El bacteriófago Q $\beta$ como modelo de evolución a alta tasa de error	23
2.7.1.- Características generales del bacteriófago Q $\beta$	23
2.7.2.- Ciclo de infección viral	24
2.7.3.- Evolución de poblaciones del bacteriófago Q $\beta$ en presencia de AZC	30
<b>3.- Objetivos</b>	<b>31</b>
<b>4.- Materiales y métodos</b>	<b>33</b>
4.1.- Bacterias y virus utilizados	33
4.1.1.- Bacterias	33
4.1.2.- Virus	33
4.2.- Procedimientos generales de infección	34
4.2.1.- Infección en medio líquido y realización de pases seriados	34
4.2.1.1.- Determinación del título viral	35
4.2.2.- Pases placa a placa	35

<b>4.3.- Obtención de clones infecciosos mediante mutagénesis dirigida</b>	<b>35</b>
<b>4.4.- Evolución experimental</b>	<b>38</b>
4.4.1.- Obtención de poblaciones virales del bacteriófago Q $\beta$ evolucionadas en presencia de concentraciones crecientes de AZC	38
4.4.2.- Propagación del bacteriófago Q $\beta$ en condiciones que favorecen su extinción	38
<b>4.5.- Caracterización genética de las poblaciones del bacteriófago Q<math>\beta</math></b>	<b>39</b>
4.5.1.- Extracción de RNA	39
4.5.2.- Obtención de cDNA y amplificación por PCR	39
4.5.3.- Purificación y cuantificación del producto de PCR	40
4.5.4.- Secuenciación del cDNA y análisis de las secuencias	40
4.5.5.- Determinación de la frecuencia de mutación	41
<b>4.6.- Caracterización fenotípica de las poblaciones del bacteriófago Q<math>\beta</math></b>	<b>41</b>
4.6.1.- Ensayos de inhibición de la replicación viral en presencia de diferentes compuestos mutagénicos, no mutagénicos e hipometilantes	41
4.6.2.- Determinación de la eficacia biológica ( <i>fitness</i> )	42
4.6.3.- Ensayos de competición entre distintos mutantes del bacteriófago Q $\beta$	42
4.6.4.- Cuantificación de la entrada del bacteriófago Q $\beta$ en <i>E.coli</i>	43
<b>4.7.- Materiales</b>	<b>43</b>
4.7.1.- Medios de cultivo y crecimiento	43
4.7.2.- Disoluciones y tampones	44
4.7.3.- Agentes mutagénicos y nucleósidos	44
4.7.4.- Agentes hipometilantes	45
<b>5.- Resultados</b>	<b>47</b>
<b>5.1.- Resultados previos sobre el efecto del AZC en el bacteriófago Q<math>\beta</math></b>	<b>47</b>
<b>5.2.- Caracterización de las poblaciones del bacteriófago Q<math>\beta</math> evolucionadas en presencia de concentraciones crecientes de AZC</b>	<b>48</b>
5.2.1.- Determinación de los títulos de clones biológicos aislados de las poblaciones del bacteriófago Q $\beta$	48
5.2.2.- Sensibilidad al AZC de las poblaciones del bacteriófago Q $\beta$	50
5.2.3.- Determinación de la frecuencia de mutación	52
<b>5.3.- Valor selectivo de las mutaciones fijadas o representadas a alta frecuencia en las poblaciones evolucionadas en presencia de AZC</b>	<b>53</b>
5.3.1.- Evolución de clones biológicos aislados de las poblaciones propagadas	

en presencia de AZC	53
5.3.2.- Valor selectivo de las mutaciones A1746U, A2982G y U3582C	54
5.3.3.- Valor selectivo de las mutaciones C3413G, G3945A y U3989C	58
<b>5.4.- Estudio de las causas de la prolongada presencia como polimorfismos de las mutaciones seleccionadas en presencia de AZC</b>	<b>60</b>
5.4.1.- Distribución de mutaciones en el espectro de mutantes de las poblaciones del bacteriófago Q $\beta$ evolucionadas en presencia de AZC	60
5.4.2.- Estudio de la interferencia entre las mutaciones A2982G y U3582C	66
<b>5.5.- Mecanismo de acción de las mutaciones localizadas en el gen de la replicasa</b>	<b>67</b>
5.5.1.- Determinación de la frecuencia de mutación de las poblaciones generadas a partir de los mutantes infecciosos Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C	67
5.5.2.- Caracterización de los espectros de mutantes de las poblaciones generadas a partir de los mutantes infecciosos Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C	69
5.5.3.- Efectos producidos por la adición de nucleósidos no mutagénicos durante la replicación en presencia de AZC	72
5.5.4.- Valor selectivo de las mutaciones A2982G y U3582C en presencia de agentes mutagénicos diferentes al AZC	76
5.5.5.- Acumulación de mutaciones en ausencia de selección en los mutantes infecciosos Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C	77
<b>5.6.- Mecanismo de acción de la mutación A1746U localizada en el gen que codifica para la proteína A1</b>	<b>80</b>
5.6.1.- Frecuencia de mutación de la población generada a partir del mutante Q $\beta$ A1746U	80
5.6.2.- Caracterización del espectro de mutantes de la población generada a partir del mutante Q $\beta$ A1746U	82
5.6.3.- Efecto de la adición de nucleósidos no mutagénicos durante la replicación del mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de AZC	82
5.6.4.- Valor selectivo del mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de agentes mutagénicos diferentes al AZC	84
5.6.5.- Estudio del valor selectivo que presenta la mutación A1746U en presencia de agentes hipometilantes	85
5.6.6.- Efecto del nucleótido inmediatamente posterior al codón de terminación UGA sobre la expresión de la proteína A1	88
5.6.7.- Adsorción del virus Q $\beta$ wt y el mutante Q $\beta$ A1746U a las bacterias hospedadoras	89
5.6.8.- <i>Fitness</i> de las poblaciones generadas tras la replicación de los virus Q $\beta$ wt y el	

mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de AZC	92
5.6.9.- Valor selectivo de la mutación A1746U en una cepa supresora de codones UGA	93

## **6.- Discusión 99**

6.1.- La estructura en cuasiespecies permite la selección de mutantes resistentes a los tratamientos con análogos de nucleósidos mutagénicos	99
6.2.- La evolución a alta tasa de error promueve la propagación simultánea de mutaciones beneficiosas	101
6.3.- Mecanismo molecular por el que las mutaciones localizadas en el gen de la replicasa confieren resistencia al AZC	102
6.4.- Posible mecanismo de acción de la mutación A1746U en la expresión de la proteína A1	104

## **7.- Conclusiones 111**

## **8.- Bibliografía 113**

## **9.- Anexo 127**

## **10.- Publicaciones 129**

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## 2.- Introducción

<b>Figura 2.1.</b> Representación del paisaje de <i>fitness</i> para una cuasiespecie viral	5
<b>Figura 2.2.</b> Estructura en cuasiespecie de los virus RNA	7
<b>Figura 2.3.</b> Evolución de la secuencia consenso y <i>fitness</i> de las poblaciones virales en función del tamaño poblacional	10
<b>Figura 2.4.</b> Transición a la catástrofe de error en las poblaciones de virus RNA	13
<b>Figura 2.5.</b> Estructura química de citidina (Cy) y 5-azacitidina (AZC)	17
<b>Figura 2.6.</b> Incorporación del AZC en el RNA y en el DNA	19
<b>Figura 2.7.</b> Estructura química de análogos de nucleósidos	21
<b>Figura 2.8.</b> Mapa genético del bacteriófago Q $\beta$	24
<b>Figura 2.9.</b> Ciclo de infección y replicación del bacteriófago Q $\beta$	25
<b>Figura 2.10.</b> Esquema de la expresión de las proteínas de cubierta y A1	27
<b>Figura 2.11.</b> Estructura cristalizada de la polimerasa viral	29

## 4.- Materiales y Métodos

<b>Figura 4.1.</b> Síntesis de la cadena mutante del plásmido conteniendo la mutación específica introducida en el genoma viral	37
<b>Figura 4.2.</b> Ensayos de competición entre los virus del bacteriófago Q $\beta$	43
<b>Tabla 4.1.</b> Mutantes infecciosos creados por mutagénesis dirigida	34
<b>Tabla 4.2.</b> Cebadores utilizados para la generación de mutantes infecciosos del bacteriófago Q $\beta$	36
<b>Tabla 4.3.</b> Concentración de AZC y número de pases realizados para la línea evolutiva Q $\beta$ AZC	38
<b>Tabla 4.4.</b> Secuencia genética de los cebadores utilizados para amplificar el genoma del bacteriófago Q $\beta$ mediante PCR	40
<b>Tabla 4.5.</b> Secuencia genética de los cebadores utilizados para secuenciar el genoma del bacteriófago Q $\beta$ mediante el método de <i>Sanger</i>	41
<b>Tabla 4.6.</b> Agentes mutagénicos y nucleósidos	45
<b>Tabla 4.7.</b> Agentes hipometilantes	45

## 5.- Resultados

<b>Figura 5.1.</b> Evolución de la población Q $\beta$ 0 en presencia y ausencia de AZC	47
<b>Figura 5.2.</b> Título promedio de las placas de lisis aisladas de las poblaciones del bacteriófago	

Q $\beta$ propagadas en presencia y ausencia de AZC	49
<b>Figura 5.3.</b> Sensibilidad al AZC de las poblaciones del bacteriófago Q $\beta$ evolucionadas en presencia y ausencia de AZC	50
<b>Figura 5.4.</b> Títulos virales obtenidos después de 10 pases seriados en presencia de 80 $\mu$ g/ml de AZC	51
<b>Figura 5.5.</b> Mutaciones fijadas o representadas a alta frecuencia en las poblaciones del bacteriófago Q $\beta$	53
<b>Figura 5.6.</b> <i>Fitness</i> relativo de los mutantes infecciosos indicados	55
<b>Figura 5.7.</b> Títulos virales obtenidos después de 10 pases seriados en presencia de 80 $\mu$ g/ml de AZC	56
<b>Figura 5.8.</b> <i>Fitness</i> relativo de los mutantes infecciosos indicados	59
<b>Figura 5.9.</b> Evolución de la población Q $\beta$ <sub>AZC(80p70)</sub> durante 20 pases adicionales en presencia de concentraciones crecientes de AZC	61
<b>Figura 5.10.</b> Análisis filogenético de los genomas virales aislados de las poblaciones del bacteriófago Q $\beta$ evolucionadas en presencia de AZC	65
<b>Figura 5.11.</b> Evolución de los virus indicados en presencia y ausencia de AZC	68
<b>Figura 5.12.</b> Frecuencia de mutación de las poblaciones evolucionadas en presencia y ausencia de AZC	69
<b>Figura 5.13.</b> Consecuencias mutagénicas de la incorporación del AZC durante la replicación del genoma viral	71
<b>Figura 5.14.</b> Replicación del bacteriófago Q $\beta$ en presencia de AZC y nucleósidos no mutagénicos	72
<b>Figura 5.15.</b> Replicación de los mutantes Q $\beta$ <sub>A2982G</sub> y Q $\beta$ <sub>U3582C</sub> en presencia de AZC y nucleósidos no mutagénicos	73
<b>Figura 5.16.</b> Esquema mostrando el ensayo de acumulación de mutaciones a través de pases placa a placa	78
<b>Figura 5.17.</b> Frecuencias de mutación de los clones biológicos obtenidos tras la evolución de los virus indicados a través de 10 pases placa a placa	79
<b>Figura 5.18.</b> Evolución del mutante infeccioso Q $\beta$ <sub>A1746U</sub> en presencia de AZC	81
<b>Figura 5.19.</b> Frecuencia de mutación de las poblaciones evolucionadas a partir de los virus indicados en presencia o ausencia de AZC	81
<b>Figura 5.20.</b> Replicación del mutante Q $\beta$ <sub>A1746U</sub> en presencia de AZC y nucleósidos no mutagénicos	83
<b>Figura 5.21.</b> Replicación del virus Q $\beta$ <sub>wt</sub> y el mutante Q $\beta$ <sub>A1746U</sub> en presencia de compuestos hipometilantes	86



<b>Figura 5.22.</b> Determinación de la tasa de adsorción para los virus Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U y las poblaciones obtenidas después de su replicación en presencia de AZC	90
<b>Figura 5.23.</b> Adsorción del bacteriófago Q $\beta$ en función de la densidad celular	91
<b>Figura 5.24.</b> Determinación del <i>fitness</i> de poblaciones virales que han replicado previamente en presencia de AZC	92
<b>Figura 5.25.</b> <i>Fitness</i> absoluto del virus salvaje y el mutante Q $\beta$ A1746U replicados previamente en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de AZC	93
<b>Figura 5.26.</b> Títulos virales obtenidos durante la replicación de los virus Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U en bacterias (S+) y (S-)	94
<b>Figura 5.27.</b> Ensayo de determinación del <i>fitness</i> de los virus Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U replicados previamente en bacterias (S+) y (S-)	95
<b>Figura 5.28.</b> <i>Fitness</i> absoluto de los virus Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U replicados previamente en bacterias (S-) y (S+)	96
<b>Tabla 5.1.</b> Frecuencias de mutación mínima y máxima calculadas para las diferentes poblaciones evolucionadas en presencia y ausencia de AZC	52
<b>Tabla 5.2.</b> Mutaciones presentes en la secuencia genómica de los clones biológicos que fueron sometidos a pases seriados en presencia y ausencia de AZC	54
<b>Tabla 5.3.</b> Competición entre el virus salvaje y los mutantes infecciosos Q $\beta$ A1746U, Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C	57
<b>Tabla 5.4.</b> Mutaciones presentes en la secuencia consenso de las poblaciones obtenidas durante la competición entre diferentes mutantes infecciosos del bacteriófago Q $\beta$	58
<b>Tabla 5.5.</b> Mutaciones presentes en la secuencia consenso de las poblaciones obtenidas durante la competición entre diferentes mutantes infecciosos del bacteriófago Q $\beta$	59
<b>Tabla 5.6.</b> Mutaciones polimórficas en la población Q $\beta$ Azc(100p90)	61
<b>Tabla 5.7.</b> Distribución de mutaciones polimórficas en los clones biológicos aislados de las poblaciones Q $\beta$ Azc(60p60), Q $\beta$ Azc(80p70) y Q $\beta$ Azc(100p90)	63
<b>Tabla 5.8.</b> Mutaciones presentes en la secuencia consenso de las poblaciones obtenidas durante la competición entre distintos mutantes infecciosos del bacteriófago Q $\beta$	66
<b>Tabla 5.9.</b> Número y tipo de mutaciones detectadas en las poblaciones virales evolucionadas en presencia y ausencia de AZC	70
<b>Tabla 5.10.</b> Secuencia consenso de las poblaciones obtenidas en los ensayos de competición entre los mutantes infecciosos Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C y el virus Q $\beta$ wt en presencia de AZC y nucleósidos no mutagénicos	74
<b>Tabla 5.11.</b> Frecuencias de mutación de las poblaciones evolucionadas en presencia de AZC	

y nucleósidos no mutagénicos	75
<b>Tabla 5.12.</b> Secuencia consenso de las poblaciones obtenidas durante la competición en presencia de AZC, Rib o 5-FU entre el virus Q $\beta$ wt y los mutantes infecciosos Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C	76
<b>Tabla 5.13.</b> Número y tipos de mutaciones detectadas en los clones biológicos aislados de la población obtenida a partir de la evolución del mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de AZC	82
<b>Tabla 5.14.</b> Competición entre el virus Q $\beta$ wt y el mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de AZC y nucleósidos no mutagénicos	84
<b>Tabla 5.15.</b> Ensayos de competición entre el virus salvaje y el mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de AZC, Rib o 5-FU	85
<b>Tabla 5.16.</b> Ensayos de competición entre el virus salvaje y el mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de AZC y diferentes compuestos hipometilantes	88
<b>Tabla 5.17.</b> Competiciones realizadas entre los virus Q $\beta$ wt, Q $\beta$ A1746U y Q $\beta$ A1746G	89
<b>Tabla 5.18.</b> Tasa de adsorción de los virus Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U en función de la densidad celular	91
<b>Tabla 5.19.</b> Relación entre los valores de <i>fitness</i> del virus Q $\beta$ wt y el mutante Q $\beta$ A1746U	97
<b>Tabla 5.20.</b> Competición entre los virus Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U en células (S-) y (S+) en ausencia de AZC	97
<b>Tabla 5.21.</b> Competición entre los virus Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U en bacterias (S-) y (S+) en presencia de bajas concentraciones de AZC	98

## 6.- Discusión

<b>Figura 6.1.</b> Competición entre el aminoacil-tRNA y el factor RF2 por la unión al codón de terminación UGA de la proteína de cubierta	106
<b>Figura 6.2.</b> Regulación de los niveles de expresión de la proteína A1 en presencia de AZC	108

## SUMMARY

---

## 1. SUMMARY

RNA viruses replicate their genomes with the highest error rates found in nature, and form populations constituted by a complex distribution of mutants referred to as quasispecies. Replication at high error rate promotes adaptation to most selective pressures and makes it difficult to find effective antiviral strategies. However, additional increases in the error rate can lead to a higher amount of deleterious mutations in the virus genomes, which is associated with fitness decreases, and eventually with the extinction of infectivity. These observations have inspired a new antiviral strategy known as lethal mutagenesis that consists in the treatment of virus infections with mutagenic agents. One of the potential advantages of lethal mutagenesis lies on the difficulties to select resistance mutants under these conditions. However, it has been demonstrated that single amino acid substitutions that modify replication fidelity can evolve in response to mutagenic treatments with nucleoside analogues, making the study of the conditions that favour the selection of these mutants highly relevant.

In this Ph.D. Thesis we have analysed the evolutionary behaviour of bacteriophage Q $\beta$  populations when replication proceeds in the presence of the mutagenic nucleoside analogue 5-azacytidine (AZC). Previous work carried out in our group demonstrated that replication in the presence of a high AZC concentration extinguished virus infectivity. However, a gradual increase in the concentration of AZC combined with transmission of the virus through large population sizes led to the selection of an adapted population. This population presented the fixation of a single mutation, A1746U in the A1 protein gene and numerous polymorphisms, some of them, such as the replicase substitutions A2982(G+A) and U3582(C+U), with demonstrated selective value in the presence of AZC. The analysis of the mutant spectra of the virus populations isolated at different points of the transfer series showed that polymorphic mutations distributed into several evolutionary lines that compete among them, making it difficult the emergence of a defined consensus sequence. The analysis of the molecular mechanisms by which substitutions A2982G (T210A) and U3582C (Y410H) increased the resistance to AZC showed that, despite being located outside the replicase catalytic site, both reduced the mutation frequency in the presence of the drug. However, they did not modify the type of AZC-induced substitutions, which was mediated mainly by ambiguous base pairing of the analogue with purines. In contrast to this, the selective advantage of substitution A1746U seems to be related to the hypomethylating action of AZC, which is associated to unbalances in the optimal amounts of coat and A1 proteins.

## INTRODUCCIÓN



## 2. INTRODUCCIÓN

Los virus y los viroides son los sistemas replicativos más simples que existen en la naturaleza. Ambos son parásitos intracelulares obligados ya que necesitan introducirse dentro de una célula hospedadora que les proporcione las moléculas y estructuras necesarias para completar su ciclo vital. Una característica que define a los virus es la gran diversidad de estrategias que pueden adoptar para su replicación, lo cual tiene como consecuencia que prácticamente todas las especies que existen en la biosfera son susceptibles de ser infectadas por algún tipo de virus (Murphy 1996). El concepto de diversidad también se extiende al tipo de ácido nucleico que pueden usar para almacenar su información genética (DNA o RNA, de cadena sencilla o doble, circular o lineal) y a las diferencias que existen entre las secuencias genómicas de los individuos que componen las poblaciones virales. La diversidad genética es mayor en los virus que tienen RNA como material genético que en los que tienen DNA, siendo esta una de las principales causas de las dificultades que existen para controlar las enfermedades causadas por estos virus (Domingo y col. 1997, Lemon 1997a, b, Webster y col. 1982). Se hace, por tanto, necesario un mejor entendimiento de los mecanismos que regulan la diversidad genética contenida en las poblaciones virales, así como de las relaciones entre diversidad y capacidad de adaptación. Los virus RNA son, además, un excelente modelo para identificar los principios generales que rigen la dinámica y las bases moleculares de la adaptación biológica, debido a que nos permiten estudiar en tiempos cortos los procesos de adaptación a los cambios en las presiones selectivas y establecer las relaciones genotipo-fenotipo más fácilmente que en otros sistemas biológicos.

### 2.1 VARIABILIDAD GENÉTICA DE LOS VIRUS RNA

La gran variabilidad genética que presentan los virus RNA se debe en gran medida a la alta tasa de error que presentan durante la replicación de su material genético. La tasa de error o tasa de mutación de un virus se define como la frecuencia de incorporación de nucleótidos erróneos durante el proceso de replicación del genoma y determina su capacidad para mantener su información esencial mientras hace frente a los cambios ambientales (Domingo y Holland 1994, Domingo y Holland 1997, Holland 1993, Holland y col. 1992). Se ha estimado que las tasas de error para los virus RNA se encuentran en un rango de entre  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  sustituciones por nucleótido y ronda de replicación (s/n/r) (Batschelet y col. 1976,

Domingo 2007, Drake y Holland 1999, Sanjuán y col. 2010), varios ordenes de magnitud más altas que las de los virus DNA ( $10^{-8}$  -  $10^{-11}$  s/n/r) (Cuevas y col. 2009, Drake 1991), o las del DNA celular ( $10^{-10}$  -  $10^{-11}$  s/n/r) (Echols y Goodman 1991, Kunkel y Alexander 1986). El elevado valor de la tasa de error de los virus RNA se debe en parte a la ausencia de actividades correctoras de las RNA polimerasas (actividad exonucleasa 3' → 5') que sí están presentes en las DNA polimerasas (Bernard y col. 1989), y a la ausencia de mecanismos de reparación post-replicativos (Friedberg y col. 2006). Otros factores que contribuyen a incrementar la variabilidad genética de los virus RNA son la recombinación genética (Domingo 2007, Domingo y col. 2008, Mikkelsen & Pedersen 2000) y los reordenamientos genómicos en los virus de genoma segmentado (Webster 1999).

Además de las diferencias en las tasas de error, otra gran diferencia entre los virus RNA y los organismos celulares radica en la porción del espacio de secuencias que ocupan. El espacio de secuencias se define como el número total de secuencias posibles que se pueden obtener a partir de un genoma de una longitud determinada (Eigen y Biebricher 1988). La capacidad para explorarlo es mayor para las poblaciones de virus que para las de organismos celulares (Domingo y Holland 1997, Domingo y col. 2006), debido principalmente a su mayor heterogeneidad genética, a sus mayores tamaños poblacionales y a la mayor complejidad de sus poblaciones.

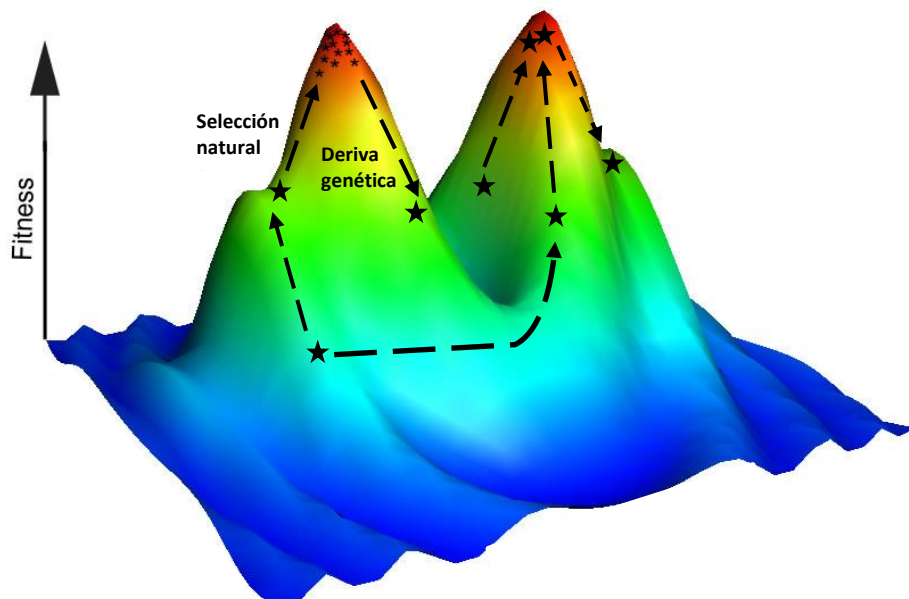
## 2.2 ESTRUCTURA DE LAS POBLACIONES DE VIRUS RNA

Las elevadas tasas de error de los virus RNA hacen que cada nuevo genoma generado difiera en una o varias mutaciones del genoma parental. La selección natural y la deriva génica van a estructurar estos conjuntos de mutantes dando lugar a poblaciones que poseen un elevado grado de organización.

### 2.2.1 Concepto de eficacia biológica

La eficacia biológica o *fitness* de un organismo es un parámetro complejo que describe la capacidad replicativa y la adaptabilidad que presenta dicho organismo en un ambiente concreto, que no está definido únicamente por parámetros químico-físicos, sino también por el resto de individuos que componen la población (Domingo y col. 1999, Williams 1992). En el caso de los virus, el *fitness* se define como la capacidad para producir progenie infecciosa viable en un ambiente dado (Domingo y Holland 1997, Domingo y col. 2003, Martínez y col. 1991) y suele expresarse como un valor relativo respecto a un virus de referencia. El *fitness* no

depende solo de la capacidad para replicar el genoma, sino también de otros procesos, como la unión a receptores específicos de la superficie celular, la entrada en la célula hospedadora o el ensamblaje y la liberación de las nuevas partículas virales (Manrubia y Lázaro 2006). El *fitness* de los distintos individuos que componen una población viral determina en gran parte su estructura, ya que los distintos mutantes van a estar más o menos representados según el valor que presenten para este parámetro. La eficacia biológica de una población puede representarse en forma de paisajes de *fitness* (**Figura 2.1**), en los cuales el nivel más bajo simboliza el conjunto de genotipos posibles (espacio de secuencias) y la altitud en cada punto representa el *fitness* asociado a esos genotipos. El contexto ambiental determina el contorno del paisaje, el cual se modifica con el tiempo debido a los continuos cambios que se producen en el ambiente. Las poblaciones se desplazarán por el paisaje de *fitness* a través de la adquisición de mutaciones que les permiten alcanzar los valores más elevados (Domingo y Holland 1997).



**Figura 2.1. Representación del paisaje de *fitness* para una cuasiespecie viral.** Las regiones más altas y estrechas que terminan en pico representan la localización de los virus que poseen los valores de *fitness* más altos. Por el contrario, las regiones más bajas o valles hacen referencia a la situación en el paisaje donde se localizan los virus que tienen *fitness* más bajos. Los procesos de selección natural y deriva genética desplazan a los conjuntos de mutantes (★) hacia las diferentes regiones del paisaje.

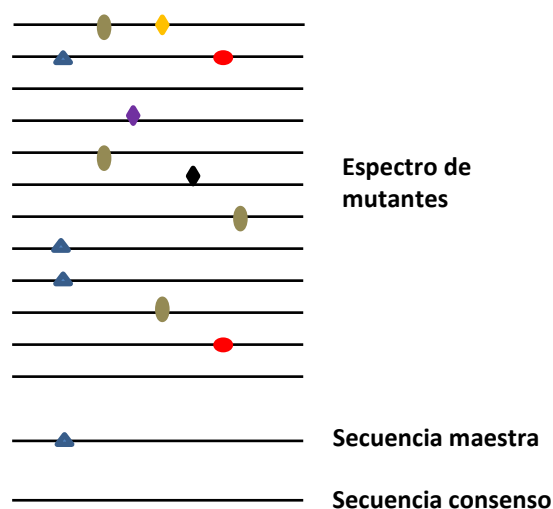


Las tasas de mutación óptimas van a depender de la velocidad y naturaleza de los cambios producidos en el paisaje de *fitness*. Cuando la tasa de mutación es baja, la secuencia que replica más rápido puede llegar a dominar la población, aun cuando su progenie sea desventajosa. Sin embargo, dado que la mayoría de las mutaciones tienen efectos deletéreos (Bell 1997, Eyre-Walker y Keightley 2007) cuando la tasa de mutación es alta se favorecen paisajes de *fitness* con un elevado grado de neutralidad, proporcionando mayor robustez frente al efecto negativo de las mutaciones. En este caso el acoplamiento entre secuencias causado por la generación de mutaciones puede llegar a ser más fuerte que los coeficientes de selección individuales (Wilke 2005).

### 2.2.2 Concepto de cuasiespecie viral

Las complejas distribuciones de mutantes que forman las poblaciones virales se conocen comúnmente con el nombre de cuasiespecies (Biebricher y Eigen 2006). El término cuasiespecie fue inicialmente propuesto por Eigen y Schuster para describir la dinámica evolutiva de las poblaciones de replicones primitivos que, según la teoría del mundo RNA, poblaron la Tierra antes del origen de la vida celular (Eigen 1971, Eigen y Schuster 1979). Según esta teoría, las cuasiespecies moleculares representan el estado estacionario alcanzado por una población infinita de replicadores que se copian a alta tasa de error en condiciones constantes durante un tiempo suficientemente largo, para alcanzar el equilibrio entre los procesos de mutación y selección. Cuando se habla de poblaciones de virus, el término cuasiespecie hace referencia a un conjunto de variantes genéticamente relacionadas a través de mutaciones, que interactúan en un nivel funcional y que contribuyen de manera colectiva a las propiedades de la población (Lauring y Andino 2010). Las cuasiespecies virales están definidas por una secuencia consenso y un espectro de mutantes (**Figura 2.2**). La secuencia consenso se define como la secuencia de nucleótidos más frecuentes en cada posición, considerando el conjunto de genomas de la población. Esta secuencia, puede coincidir o no con la secuencia maestra, que es aquella que tiende a dominar en el conjunto de genomas de la población al proporcionar mayor eficacia biológica al individuo de la población que la posee. En poblaciones con un alto grado de neutralidad no se puede hablar de la existencia de una secuencia maestra única, siendo en muchos casos no identificable, e incluso minoritaria en la población (Domingo 1994). El resto de los genomas que componen la cuasiespecie constituyen lo que se denomina el espectro de mutantes. Todos los genomas que constituyen una cuasiespecie, no solo la secuencia maestra, ayudan a perpetuar la población con el mantenimiento de la eficacia biológica (Eigen 1993). Las cuasiespecies virales pueden caracterizarse en base a cinco parámetros relevantes que permiten definir la estructura de la

población (Domingo 1994, Domingo y col. 2001) y que son el número promedio de mutaciones por genoma en el espectro de mutantes, el tamaño poblacional, la longitud del genoma, el número medio de mutaciones necesarias para un cambio fenotípico y la fecundidad.



**Figura 2.2. Estructura en cuasiespecies de los virus RNA.** Las líneas horizontales representan los genomas virales y los símbolos sobre ellas representan las mutaciones respecto a la secuencia consenso. Debajo del espectro de mutantes se indica la secuencia maestra y la secuencia consenso de la población.

### 2.2.3 Interacciones en el espectro de mutantes

Los efectos de las mutaciones en el *fitness* no siempre son absolutos, sino que pueden variar dependiendo del ambiente en el que tiene lugar la replicación (Elena y Lenski 2003), del contexto mutacional, es decir, de las mutaciones previamente acumuladas, y de la propia eficacia biológica. El efecto de la interacción entre mutaciones se conoce como epistasis (Burch y Chao 2004, Fisher 1918, Phillips 2008, Wolf y col. 2000, Lázaro 2014) y es muy frecuente en los virus RNA. Se han documentado ejemplos en varios virus como el de la estomatitis vesicular (VSV), virus del grabado del tabaco (VGT), fiebre aftosa (VFA), chikungunya y el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), pudiendo ocurrir tanto entre mutaciones deletéreas como beneficiosas (Bonhoeffer y col. 2004, Elena 1999, Lalic y Elena 2012, Sanjuán y col. 2004, Tsetsarkin y col. 2009). Las interacciones epistáticas pueden clasificarse en sinérgicas o antagonísticas (Churchill 2001), y estas a su vez pueden ser positivas o negativas (de Visser y col. 2011). La epistasis antagonística entre mutaciones deletéreas y la epistasis sinérgica entre mutaciones beneficiosas representan fenómenos de epistasis positiva, mientras que la

situación contraria, representa fenómenos de epistasis negativa. Un tipo particular de epistasis lo representan las mutaciones compensatorias, las cuales son mutaciones neutrales o deletéreas que adquieren efectos beneficiosos dentro del contexto de otras mutaciones deletéreas. La existencia de este tipo de mutaciones se ha descrito en mutantes de resistencia a drogas, donde el coste en *fitness* causado por estas mutaciones es compensado por la adquisición de otras nuevas (Buckheit 2004, Maisnier-Patin y Andersson 2004).

Una consecuencia directa de las altas tasas de error que presentan los virus RNA es que dentro de una misma célula hospedadora la diversidad genética puede llegar a ser muy amplia, pudiéndose generar mutantes con habilidad reducida para replicarse o para codificar proteínas funcionales. Estos genomas pueden comportarse como genomas defectivos, en el caso de que su supervivencia en la población sea posible gracias al uso de los recursos producidos por los virus viables (Grande-Pérez y col. 2005). En ese caso, los virus defectivos pueden actuar como parásitos de los virus viables e interferir en la replicación eficiente de estos (Crotty y col. 2001, Crotty y col. 2002, González-López y col. 2004, Severson y col. 2003). La gran cantidad de virus que pueden coexistir en una misma célula hospedadora también ha permitido mostrar la existencia de estrategias de cooperación tanto en el caso de fenómenos de co-infección (Turner y Chao 2003), como entre las variantes que constituyen una cuasiespecie, donde la composición del espectro de mutantes puede determinar el comportamiento colectivo de la población (Vignuzzi y col. 2006).

### 2.3 LAS CUASIESPECIES COMO SISTEMAS ADAPTATIVOS

Las mutaciones beneficiosas son el sustrato sobre el que la selección natural actúa para conducir a la adaptación. Sin embargo, la evolución de las poblaciones virales también está influida por fenómenos aleatorios causados por la deriva genética. La intensidad de la deriva genética va a depender fundamentalmente del tamaño poblacional. A bajo tamaño poblacional, el efecto producido por la selección natural puede ser muy pequeño comparado con el efecto ejercido por la deriva génica. En ese caso, las mutaciones tienden a fijarse de manera aleatoria y, puesto que la mayoría de ellas tienen efecto deletéreo, se produciría una disminución de la eficacia biológica. Sin embargo, dado que las poblaciones de virus pueden alcanzar grandes tamaños durante su infección, su evolución va a estar determinada por la combinación de periodos en los que predomina la selección natural con otros en los que predomina la deriva génica (Cuevas y col. 2009). Para que una mutación beneficiosa se fije en la población, es necesario que sobreviva a la deriva génica y que bajo la influencia de la

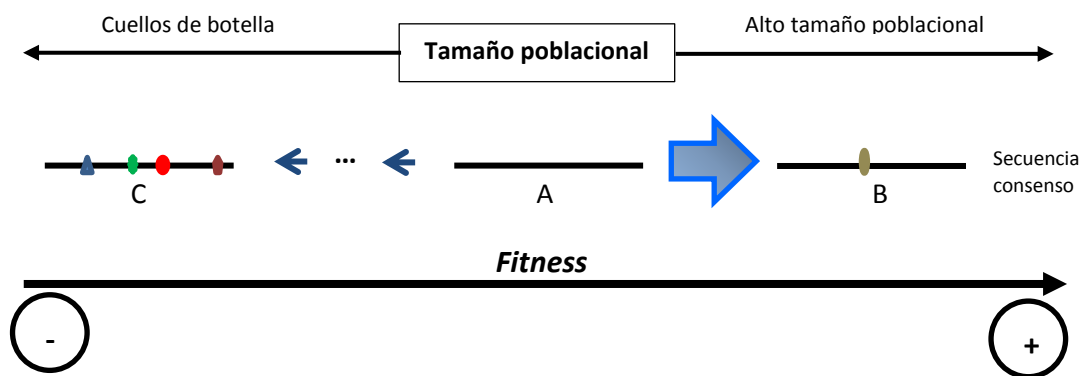
selección natural desplace al resto de los genomas. Cuando varias mutaciones beneficiosas presentes en diferentes genomas se propagan simultáneamente en una población asexual en ausencia de recombinación, su fijación puede retrasarse debido a la competición entre dichas mutaciones, lo que se conoce como dinámica de interferencia. En base a los efectos que ejercen las mutaciones beneficiosas y los diferentes contextos genéticos donde pueden surgir, existen tres modelos teóricos para explicar la dinámica de interferencia entre mutaciones: El modelo de interferencia clonal, que asume que la mayoría de las mutaciones beneficiosas tienen valor selectivo diferente y aparecen en contextos genéticos ya establecidos (Gerrish y Lenski 1998, Wilke 2004), el modelo de mutaciones múltiple, que asume que las mutaciones beneficiosas presentan un valor selectivo similar y pueden aparecer en cualquier contexto genético, (Brunet y col. 2008, Desai y Fisher 2007, Desai y col. 2007), y el modelo de interferencia completa, que considera que las mutaciones beneficiosas pueden diferir tanto en sus efectos como en el contexto genético en el que aparecen (Hegreness y col. 2006, Park y Krug 2007). Los virus RNA, con sus grandes tamaños poblacionales y sus elevadas tasas de error, son candidatos a generar mayor número de mutaciones beneficiosas que otros sistemas biológicos. Estas mutaciones pueden interferir entre ellas tal y como está demostrado (Betancourt 2009, Holder y Bull 2001, Miralles y col. 1999, Wichman y col. 1999), lo que puede causar su eliminación antes de llegar a fijarse.

### **2.3.1 Factores que influyen en la evolución de las poblaciones virales**

#### ***Tamaño poblacional***

El número de individuos que va a dar lugar a la siguiente generación de una población, es decir, el tamaño poblacional, va a tener un efecto muy importante en la variación de la eficacia biológica de dicha población y por tanto en su velocidad de adaptación (Domingo y col. 1999, Domingo y col. 2001). Las poblaciones virales que evolucionan a alto tamaño poblacional permiten la competición entre mutantes diferentes, lo cual conduce a ganancias de *fitness* debido a la selección positiva de los genomas más eficaces (Arias y col. 2001, Clarke y col. 1993, Escarmís y col. 1998, Martínez y col. 1991, Novella y col. 1995a, Novella y col. 1995b). Por el contrario, la sucesión de cuellos de botella poblacionales representa reducciones en la diversidad genética, dando lugar a la fijación rápida de mutaciones y causando la desviación progresiva de la secuencia consenso inicial hacia una secuencia consenso nueva. En estas circunstancias se suelen producir disminuciones en la eficacia biológica de las poblaciones, las cuales podrían llegar a extinguirse si no existen mecanismos compensatorios que restauren la situación inicial (**Figura 2.3**) (Cases-González y col. 2008, Domingo y Holland 1997, Domingo y

col. 1996, Domingo y col. 1999, Escarmís y col. 1999, Lázaro y col. 2003). Este tipo de acumulación de mutaciones deletéreas fue inicialmente propuesto por Müller en 1964, como una causa frecuente de extinción en las poblaciones pequeñas de organismos asexuales que replican con altas tasas de mutación (Müller 1964). Un ejemplo experimental de reducciones poblacionales extremas es el de la transmisión de virus a través de pases placa a placa, un proceso en el que el tamaño poblacional se reduce a un único individuo. Diversos estudios llevados a cabo con el VFA mostraron que la transmisión de varios clones virales a través de un número muy elevado de pases placa a placa aceleraba la fijación de mutaciones. Las poblaciones, sin embargo, no llegaban a extinguirse debido a la fijación de mutaciones compensatorias en los genomas que habían alcanzado valores muy bajos de *fitness* (Escarmís y col. 2006, Manrubia y col. 2005).



**Figura 2.3. Evolución de la secuencia consenso y *fitness* de las poblaciones virales en función del tamaño poblacional.** Las líneas hacen referencia a los genomas que constituyen las secuencias consenso y los puntos sobre ellas indican las mutaciones adquiridas durante la transmisión. Cuando la población inicial (A), se transmite utilizando tamaños poblacionales elevados (flecha grande), da lugar a una población (B), en la que se ha producido la fijación de mutaciones con valor selectivo en la secuencia consenso. Esto produce aumentos de *fitness*. Por el contrario, cuando la población A se transmite a través de tamaños poblacionales reducidos (flechas pequeñas) se produce la fijación de mutaciones independientemente de su valor selectivo, dando lugar a una nueva secuencia consenso (C). Esto conduce a pérdidas de *fitness* que pueden provocar la extinción de la población.

### ***Tasa de error***

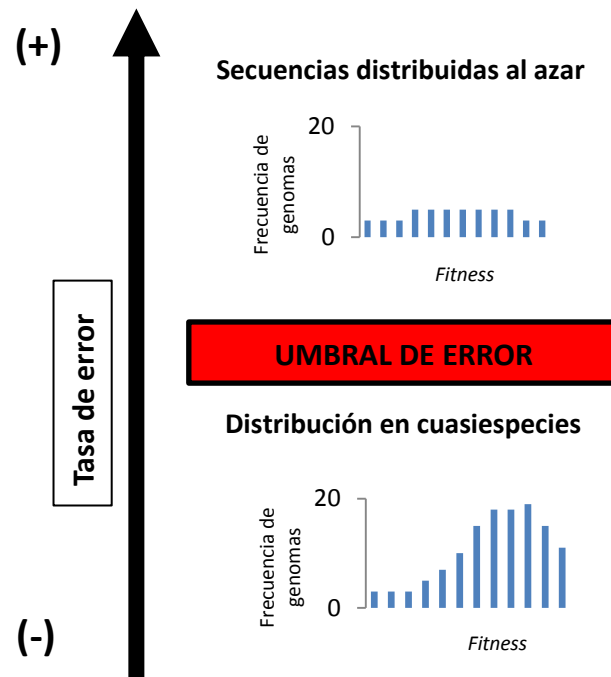
Los efectos producidos en la capacidad adaptativa viral como consecuencia de las variaciones en la tasa de error van a depender del efecto promedio que tengan las mutaciones en el *fitness*. En el caso de que las mutaciones beneficiosas estén favorecidas, los virus serán más tolerantes a los incrementos adicionales en la tasa de error, mientras que si predominan las mutaciones deletéreas, el efecto será negativo. Dado que las mutaciones deletéreas son más frecuentes que las beneficiosas, se suele aceptar que los incrementos en la tasa de error conducen a pérdidas de *fitness* (Arias y col. 2013, Arribas y col. 2011, Crotty y col. 2001). Sin embargo, la generación de mutaciones beneficiosas es más abundante de lo que se estimó en principio (Sniegowski y Gerrish 2010) y depende de factores tales como el tamaño poblacional, la propia tasa de error y el grado de adaptación de la población. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio demostraron que en virus de baja eficacia biológica se podía producir una mayor proporción de mutaciones beneficiosas que en los de alta eficacia biológica (Cases-González y col. 2008).

Las diferencias en las tasas de mutación que se observan en diferentes especies indican que a través de la evolución se han seleccionado los valores óptimos para este carácter y se ha sugerido que la variabilidad ambiental puede ser un factor que determine estos valores (Drake y Holland 1999, Drake y col. 1998). La fidelidad de replicación del DNA va a depender de la alta precisión de copia que presentan las DNA polimerasas mediante su actividad correctora de errores. Sin embargo, esta precisión puede modificarse si el ambiente lo requiere. Un ejemplo de ello lo representa la selección en condiciones de estrés de bacterias mutadoras que carecen de algunas de las actividades correctoras de errores de las polimerasas. Estas variantes promueven la aparición de individuos capaces de reproducirse de manera eficiente en las condiciones estresantes (Tanaka y col. 2003). En el caso de los virus RNA, se ha interpretado que la ausencia de actividades correctoras de errores de las RNA polimerasas representa un mecanismo que favorece una rápida adaptación a los cambios ambientales (Lauring y Andino 2010). Las altas tasas de error que presentan las RNA polimerasas pueden ser, sin embargo, una consecuencia indirecta de la elevada velocidad a la que estos virus replican sus genomas (Furió y col. 2005, 2007).

## 2.4 EVOLUCIÓN DE LOS VIRUS RNA A TASA DE ERROR INCREMENTADA

El hecho de que las poblaciones de virus RNA repliquen con tasas de mutación tan elevadas, hace que sean muy susceptibles a los incrementos adicionales de las mismas (Eigen 2002, Holmes 2003, revisado en Lázaro 2014). Experimentos tempranos llevados a cabo con el VSV mostraron que el incremento en la tasa de error por la adición de mutágenos químicos como 5-fluorouracilo (5-FU), 5-azacitidina (AZC) o ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) producía una disminución del *fitness* y de la infectividad viral (Holland y col. 1990, Lee y col. 1997). Estos descensos en el *fitness* asociados al empleo de agentes mutagénicos podrían conducir a las poblaciones virales a la extinción relacionando así la frecuencia de mutación en el espectro de mutantes con la estabilidad de las poblaciones (Holland y col. 1990). La teoría de cuasiespecies predice que esta estabilidad puede verse perjudicada cuando la tasa de error alcanza un límite, conocido como umbral de error, que es incompatible con el mantenimiento de la información genética (Biebricher y Eigen 2005, Eigen 1971, Eigen 2002, Nowak y Schuster 1989). En este punto, un pequeño aumento de la tasa de mutación puede conducir a un cambio esencial en la composición de los genomas de la población. El umbral de error va a depender tanto de la complejidad de la población como de la superioridad de la secuencia maestra sobre el espectro de mutantes (Domingo y Holland 1997). Cuando este umbral se sobrepasa, todas las secuencias genómicas son igualmente probables y la población organizada como cuasiespecie pasa a estar formada por un conjunto de genomas distribuidos al azar, produciéndose así la pérdida de la información genética. Este fenómeno es lo que se conoce como transición a la catástrofe de error (Eigen y Biebricher 1988, Swetina y Schuster 1982) (**Figura 2.4**).

Existen numerosos ejemplos de que los virus RNA replican con una fidelidad de copia cercana al valor máximo que es compatible con el mantenimiento de sus poblaciones (Domingo y col. 1999) y que pequeños aumentos causados por el tratamiento con agentes mutagénicos producen la extinción de las mismas (Graci y col. 2008, Grande-Pérez y col. 2002, Lanford y col. 2001, Lee y col. 1997, Loeb y Mullins 2000, Loeb y col. 1999, Pariente y cols. 2001, Tapia y col. 2005). El fenómeno de extinción de la infectividad viral mediante el tratamiento con mutágenos ha dado lugar al desarrollo de una nueva estrategia antiviral conocida como mutagénesis letal.



**Figura 2.4. Transición a la catástrofe de error en las poblaciones de virus RNA.** La distribución de los genomas que componen una cuasiespecie varía en función de si replican por debajo o por encima del umbral de error. Los aumentos en la tasa de error hacen que las poblaciones repliquen por encima del umbral de error, haciendo que el *fitness* medio de las poblaciones disminuya y la estructura de la cuasiespecie se pierda, pasando a convertirse en un conjunto de genomas distribuidos al azar.

El término mutagénesis letal fue acuñado por Loeb y sus colaboradores en estudios llevados a cabo con VIH-1 (Loeb y Mullins 2000, Loeb y col. 1999). Posteriormente, estudios llevados a cabo con poliovirus mostraron que durante el tratamiento con ribavirina el mutágeno era incorporado durante la replicación aumentando el número de transiciones en los genomas virales, las cuales reducían la infectividad específica viral pudiendo resultar extinguidas (Crotty y col. 2000). Existen además otros estudios en los que se ha documentado la extinción de los virus RNA tras su tratamiento con diferentes análogos de nucleósidos mutagénicos como 5-FU o AZC (Agudo y col. 2009, Dapp y col. 2009, Sierra y col. 2000). Las extinciones observadas durante la mutagénesis letal pueden ocurrir a través de la combinación de varios factores, todos ellos causados por el exceso de mutaciones. Entre estos factores se encuentran la disminución de la capacidad replicativa viral, las dificultades para mantener la información genética y el incremento en las interacciones defectivas entre virus mutagenizados.



## 2.5 SELECCIÓN DE MUTANTES VIRALES EN PRESENCIA DE ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS MUTAGÉNICOS

La mutagénesis letal se basa en la suposición de que la selección natural se encuentra muy desfavorecida a tasas de error incrementadas, lo que llevó a pensar que en estas condiciones no se seleccionarían mutantes de resistencia, constituyendo una gran ventaja frente a otros tipos de terapias. Sin embargo, dado que las cuasiespecies víricas contienen un número muy elevado de variantes (Domingo y col. 1985, Domingo y col. 1988, Eigen 1971, Eigen y Schuster 1979, Wimmer y col. 1993), no tardaron en encontrarse mutantes de resistencia a mutágenos (revisado en Lázaro 2014). El primero de ellos fue un mutante de poliovirus, aislado durante un tratamiento con ribavirina, el cual poseía una RNA replicasa con mayor fidelidad que el virus salvaje (Pfeiffer y Kirkegaard 2003, Vignuzzi y col. 2006). Este mutante que presentaba un único cambio en un aminoácido situado en el dominio *finger* de la replicasa demostró que los residuos que se encuentran lejos del centro activo también pueden modular la fidelidad de la enzima. El hecho de que una única sustitución fuera suficiente para incrementar de 3 a 5 veces la fidelidad de copia de la polimerasa sugiere que los virus RNA no han seleccionado estas variantes de fidelidad a lo largo de la evolución debido a las ventajas que ofrecen las altas tasas de error. Diversos experimentos realizados con el mutante de poliovirus demostraron que, aunque su cinética de replicación en ensayos *in vitro* y en ausencia de cualquier presión selectiva era similar a la del virus salvaje, el virus había disminuido su *fitness* y su virulencia en ensayos *in vivo* y bajo una presión selectiva definida (Pfeiffer y Kirkegaard 2005). Los estudios llevados a cabo por Vignuzzi y col. mostraron que este mutante era incapaz de competir con el virus salvaje bajo condiciones adversas, atribuyendo estos resultados a una pérdida de las interacciones cooperativas entre los individuos que forman el espectro de mutantes, sugiriendo que la selección actúa a nivel poblacional y no de forma individual (Vignuzzi y col. 2006).

Además se han aislado mutantes de fidelidad en otros virus como Chikungunya (Coffey y col. 2011), CVB3 (Levi y col. 2010), enterovirus (Sadeghipour y col. 2013) y VFA (Arias y col. 2008). En el caso del VFA se han aislado diferentes mutantes resistentes a ribavirina. Uno de ellos, que presenta la mutación M296I en el centro catalítico de la replicasa, produce la disminución de la incorporación de ribavirina en el RNA viral, sin alterar apenas la fidelidad general de la polimerasa. Este mutante puede incorporar mutaciones adicionales que incrementan la resistencia a ribavirina, como es el caso de la sustitución P44S, que es capaz de reducir el sesgo mutacional ocasionado por la ribavirina sin alterar la frecuencia de mutación en el espectro de mutantes (Agudo y col. 2010). En el caso del virus Chikungunya, la mutación

de fidelidad C483Y localizada en la replicasa del virus se aisló tras varios pases en presencia de ribavirina y 5-FU. Esta mutación producía un coste en *fitness* cuando se enfrentaba a cambios en las presiones selectivas. El aislamiento de este tipo de mutantes muestra que las poblaciones generadas cuando la replicación ocurre con mayor fidelidad y que, por tanto, presentan menor heterogeneidad, tienen menos éxito cuando se enfrentan a ambientes complejos.

Se ha propuesto que las altas tasas de error que presentan los virus RNA también pueden promover la selección de la robustez mutacional como un mecanismo para resistir los efectos deletéreos que presentan las mutaciones (Elena 2012, Luring y col. 2013, Lázaro 2014). Esta robustez se expresa como el mantenimiento del fenotipo a pesar de las variaciones en el genotipo (Montville y col. 2005, Waddington 1957). Sin embargo, no está claro que la selección natural favorezca directamente la robustez mutacional (Sanjuán y col. 2007). La alta capacidad que presentan los virus de RNA para mutar y adaptarse va en contra de la idea misma de robustez, ya que si un fenotipo es robusto, sería esperable que una población tuviera dificultades para adaptarse a un cambio ambiental. La robustez mutacional puede impedir o facilitar la adaptación en función del tamaño poblacional, de la tasa de mutación y de la estructura del paisaje de *fitness*. En poblaciones de alto tamaño poblacional, como son las poblaciones de virus RNA, la selección negativa puede eliminar los genomas menos viables, dando lugar a poblaciones en las que las secuencias de mayor *fitness* dominan en el espectro de mutantes, garantizando la robustez mutacional (Elena 2012, Luring y col. 2013). Además, las poblaciones de virus RNA pueden volverse robustas mediante la migración de sus genomas hacia regiones del espacio de secuencias donde el efecto deletéreo de las mutaciones sea menos perjudicial. En estas regiones, cada secuencia de nucleótidos está rodeada por un conjunto de genomas que poseen valores de *fitness* similares y que difieren en una o muy pocas mutaciones, estableciendo una red neutral (Elena 2012, Luring y col. 2013). Sin embargo, la robustez puede aumentar la variación genética de una población permitiendo interacciones epistáticas entre las mutaciones neutrales. Esto aumentaría el rango de fenotipos adaptativos disponibles en el espacio de secuencias.

Como conclusión se puede afirmar que los virus RNA pueden utilizar diferentes mecanismos para evitar las consecuencias negativas del aumento de la tasa de error (Escarmís y col. 2008, Hmwe y col. 2010, Perales y col. 2011). Por tanto, los incrementos en las tasas de error constituyen una presión selectiva a la que los virus son capaces de adaptarse, ya sea mediante el aumento de la fidelidad general de las replicasas (Coffey y col. 2011, Levi y col.

2010), de la mejora del reconocimiento de los nucleósidos normales frente los análogos mutagénicos (Agudo y col. 2010, Arias y col. 2008) o a través del incremento de la robustez mutacional (Elena 2012, Lauring y col. 2013).

## 2.6. ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS MUTAGÉNICOS

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha aumentado de forma artificial la tasa de error de la replicación viral mediante el uso de análogos de nucleósidos mutagénicos, utilizados comúnmente tanto para el tratamiento de enfermedades microbianas, como en terapias contra el cáncer. En concreto se ha utilizado como agente mutagénico principal el análogo del nucleósido citidina, 5-azacitidina (AZC). Además se han utilizado otros dos análogos de nucleósidos, el 5-Fluorouracilo (5-FU) y la ribavirina (Rib), y se han comparado sus efectos con los producidos por el AZC.

### 2.6.1 AZC

El nucleósido 5-azacitidina (4-amino-1- $\beta$ -D-ribofuranosil-S-triazina-2(1H)-ona), es un análogo mutagénico del nucleósido citidina en el que el grupo CH de la posición 5 del anillo pirimidínico está sustituido por un átomo de nitrógeno (grupo azo) (**Figura 2.5**). Se sintetizó por primera vez en 1964 a partir de una molécula de 1-glicosil isocianato peracetilado (Piskala y Sorm 1964). Originalmente fue desarrollado y probado como un antimetabolito de nucleósidos con especificidad clínica contra células cancerosas cultivadas y como un agente quimioterapéutico eficaz contra la leucemia mielógena aguda (Cihak 1974, Sorm y col. 1964). Sin embargo, los primeros estudios indicaron que el AZC era un inductor de la rotura de cromosomas y un mutágeno (Christman 2002, Halle 1968, Karon y Benedict 1972, Landolph y Jones 1982, Paul 1982, Viegas-Pequignot y Dutrillaux 1976).

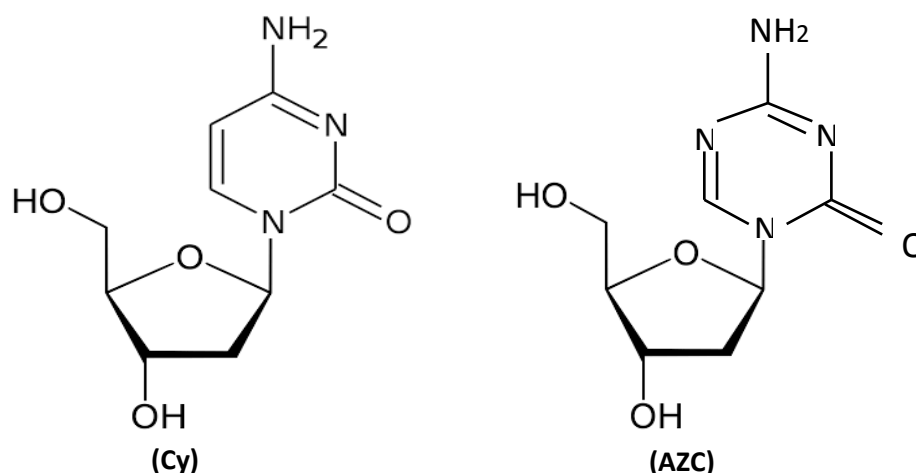
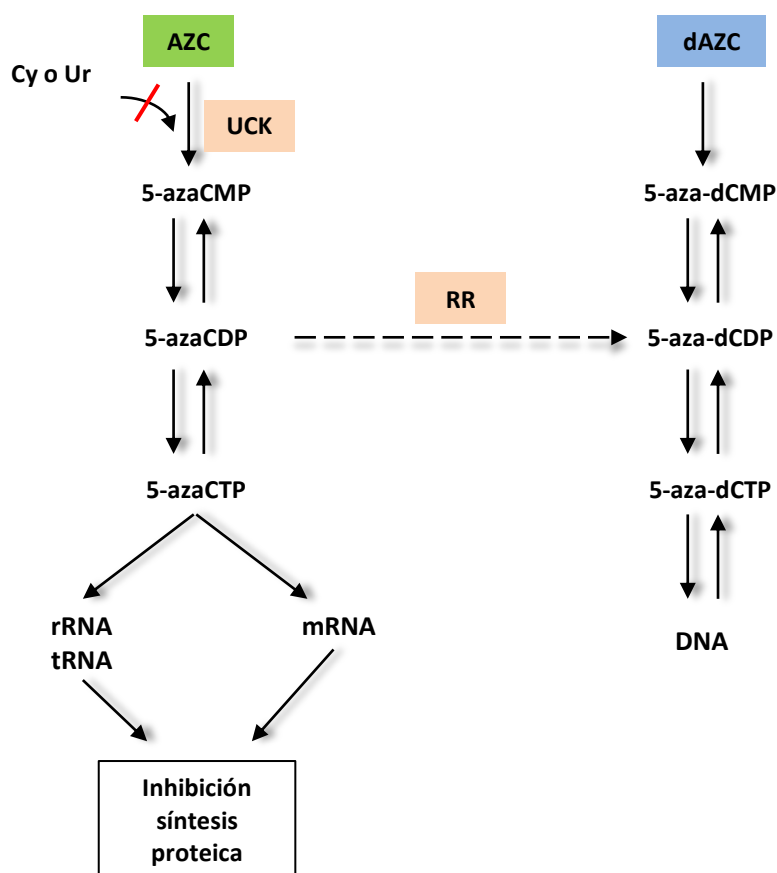


Figura 2.5. Estructura química de citidina (Cy) y 5-azacitidina (AZC).

#### 2.6.1.1 Metabolismo del AZC

La similitud estructural entre el AZC y el nucleósido citidina (Figura 2.5) le permite entrar en las células utilizando los sistemas de entrada de las bases pirimidínicas. En el interior celular puede incorporarse en las rutas metabólicas celulares o introducirse de forma errónea durante la replicación del RNA viral. La fuerte actividad citidina desaminasa que contienen las células de *Escherichia coli* (*E.coli*) hacen que el AZC sea rápidamente desaminado en el cultivo bacteriano, convirtiéndose en 5-azauridina (Cihak y Sorm 1965). Estudios llevados a cabo con cepas bacterianas carentes de citidina desaminasa demostraron que esta actividad es esencial para que el AZC, una vez desaminado a 5-azauridina, ejerza su efecto inhibidor de la síntesis de proteínas (Dorskocil y Sorm 1970, Friedman 1982). Sin embargo, dicha actividad no es necesaria para la incorporación del AZC en el RNA. Por otro lado, Cihak y Sorm (1965) y Hanka y col. (1966) señalaron que la citidina, la uridina y la timidina, pero no el uracilo o la citosina, podían revertir el efecto antimicrobiano del AZC, sugiriendo que este compuesto podía interferir en el metabolismo de los ácidos nucleicos compitiendo con la uridina y la citidina por su fosforilación. Se han descrito varias vías que puede seguir el AZC que hacen que interfiera con el metabolismo de los ácidos nucleicos (Baghwat y Roberts 1987, Von Hoff y Slavik 1977):

1. Incorporación en el DNA y RNA: El AZC una vez fosforilado puede incorporarse en el DNA reemplazando en un 52% a la citosina, y en polinucleótidos de RNA, donde reemplaza entre un 20 – 30 % a la citidina (Karon y Benedict 1970, Paces y col. 1968, Zadrazil y col. 1965).
2. Competición por la uridina-citidina kinasa: La uridina-citidina kinasa (UCK) cataliza la fosforilación de uridina y citidina, de manera que en presencia de AZC estos nucleósidos compiten por su fosforilación. La fosforilación del AZC permite en último término su incorporación al RNA mediante la formación de 5-azacitidina trifosfato (5-azaCTP) o al DNA mediante su conversión a través de la enzima ribonucleótido reductasa (RR) y posterior fosforilación a 5-aza-2'-deoxicitidina trifosfato (5-aza-dCTP) (**Figura 2.6**) (Aimiwu y col. 2012, Cihak y Vesely 1973, Vesely y col. 1967, Vesely y col. 1968b, Vesely y col. 1970).
3. Inhibición de la enzima orotidilato descarboxilasa: Estudios llevados a cabo en ratones con el virus de la leucemia murina demostraron que el AZC bloqueaba *de novo* la síntesis de las pirimidinas al interferir con la enzima orotidilato descarboxilasa (Vesely y col. 1968a), incrementando la excreción de ácido orótico y orotidina (Raska y col. 1965).



**Figura 2.6. Incorporación del AZC en el RNA y en el DNA.** El AZC compite con uridina (Ur) y citidina (Cy) por la enzima UCK. Si el AZC es fosforilado se convierte en 5-azactidina monofosfato (5-azaCMP), el cual mediante mono- o difosfato-quinasas se fosforila a 5-azaCTP. Este compuesto es incorporado en los diferentes RNAs. A su vez el 5-azaCDP es convertido a 5-aza-2'-deoxicitidina difosfato (5-aza-dCDP) mediante la enzima RR. Este compuesto puede producirse además por la fosforilación directa del 5-aza-2'-deoxicitidna (dAZC), el cual difiere estructuralmente del AZC por llevar un anillo de desoxirribosa. El 5-aza-dCTP producido por sucesivas fosforilaciones es incorporado en el DNA.

### 2.6.1.2 Mecanismo de acción del AZC

Los efectos producidos por la presencia de AZC han sido ampliamente descritos tanto en virus como en bacterias (Friedman 1982, Lal y col. 1987, Pathak y Temin 1992). En el caso de las bacterias, algunos de estos efectos son i) el aumento del número de mutaciones producidas durante la replicación del genoma, ii) la inhibición del crecimiento bacteriano y iii) la inhibición de la síntesis proteica. Estos efectos han sido estudiados en gran medida en la bacteria *E.coli*, donde se ha visto que el AZC puede ser fosforilado e incorporado tanto en el

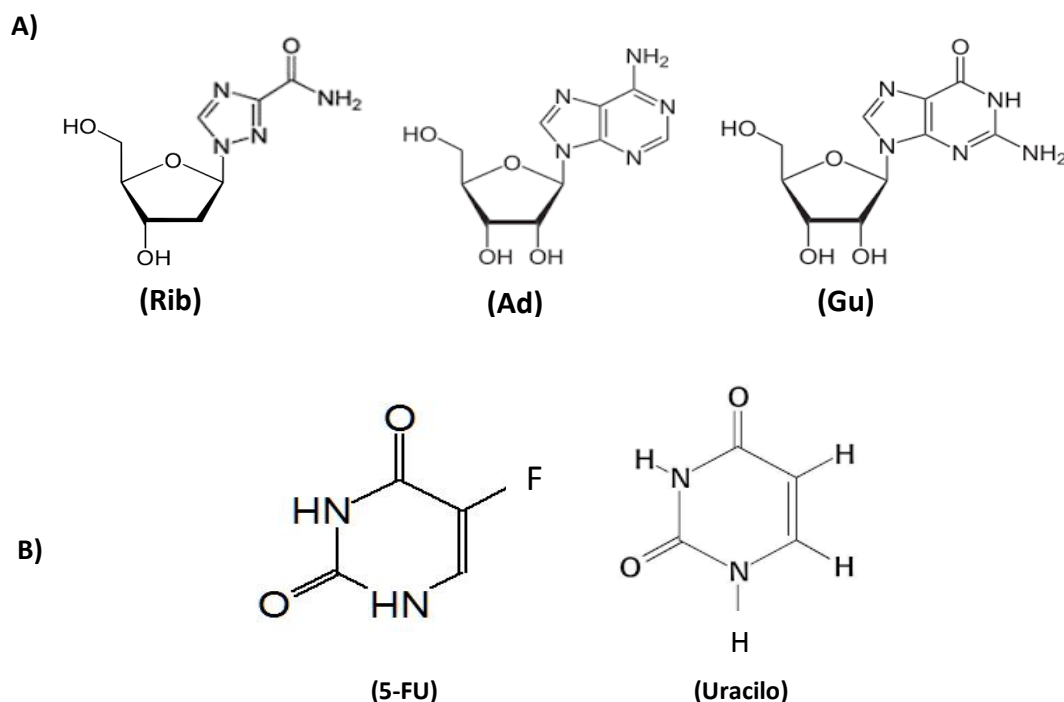
RNA como en el DNA bacteriano (Daskalakis y col. 1967, Daskalakis y Sorm 1969, Lal y col. 1988, Paces y col. 1968).

En el caso de los virus, estudios llevados a cabo por Daskalakis y Sorm con el fago f2 mostraron que en presencia de AZC se producía una inhibición de la síntesis proteica general, incluyendo la síntesis de la proteína de cubierta del fago y una alteración en el RNA viral. Estos mismos autores en estudios llevados a cabo con el bacteriófago T4, mostraron que a concentraciones por encima de 0,5 µg/ml de AZC, se observaba una fuerte inhibición de la producción de partículas virales (Daskalakis y Sorm 1967). En el caso del bacteriófago Qβ también se ha demostrado la mutagenicidad del AZC y su efecto inhibitorio sobre la replicación viral (Arribas y col. 2011, Cases-González y col. 2008).

Otro de los efectos que ejerce el AZC y que ha sido objeto de estudio tanto en eucariotas como en procariotas es la hipometilación de los ácidos nucleicos, tanto del DNA y el RNA (Hagemann y col. 2011, Santini 2012, Schaefer y col. 2009), como de los rRNAs y tRNAs, afectando a la regulación de la expresión de un gran número de genes (Egger y col. 2004) y produciendo una inhibición de la síntesis proteica (Bhagwat y Roberts 1987; Jones 1984, 1985; Taylor y col. 1984). La observación de que la actividad citosina metilasa del DNA bacteriano se inactivaba en presencia de AZC supuso un gran avance en la investigación del mecanismo por el cual el AZC causaba la hipometilación de los ácidos nucleicos (Friedman 1981, Santi y col. 1984). Las citosina metilasas se unen covalentemente en la posición 6 de la citosina y después de permitir la transferencia del grupo metilo a la posición 5 de la citosina, la enzima se separa. Si el AZC se incorpora al DNA o al RNA en el sitio de metilación, se impide que tenga lugar la reacción de transferencia del grupo metilo y como consecuencia de esto la citosina metilasa no se desprende, formando complejos estables con el ácido nucleico que lleva incorporado una molécula de AZC (Christman y col. 1983, Creusot y col. 1982, Taylor y Jones 1982). Por tanto, es probable que la rápida reducción de la actividad citosina metilasa y la posterior hipometilación del DNA o RNA sean debidos a la unión irreversible de la enzima al DNA o al RNA que llevan incorporadas moléculas de AZC. Se ha demostrado además, que la incorporación del AZC en el tRNA produce una inhibición de las tRNA metiltransferasas interfiriendo con la metilación y el procesamiento del tRNA (Lee y Karon 1976, Lu y Randerath 1980). El estado de metilación también juega un papel importante en el procesamiento del rRNA (Glazer y col. 1980, Weiss y Pitot 1974a, 1974b), de manera que la incorporación del AZC en el RNA puede ser responsable en último término de la inhibición de la síntesis proteica (Christman 2002).

## 2.6.2 Ribavirina y 5-FU

La ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1-*H*-1,2,4-triazol-3-carboxamida), es un análogo purínico que posee un efecto antiviral de amplio espectro que ha sido utilizado para el tratamiento de las infecciones causadas por varios virus RNA, como el virus de la Hepatitis C (VHC), y también de algunos virus DNA (Cummings y col. 2001, Davis y col. 1998, Mangia y col. 2005) (**Figura 2.7a**). El 5-FU es un análogo de uracilo en el que el átomo de hidrógeno del carbono 5 del anillo está substituido por un átomo de flúor (**Figura 2.7b**). Fue sintetizado en 1957 por Heidelberger y cols. (Heidelberger y col. 1957) como agente antitumoral basándose en la observación obtenida en hepatomas de ratas, en los cuales la utilización del uracilo se veía alterada respecto a tejidos sanos, indicando que el metabolismo del uracilo era una diana potencial de quimioterapia (Rutman y col. 1954).



**Figura 2.7. Estructura química de análogos de nucleósidos. A)** Estructura química de Rib, adenosina (Ad) y guanosina (Gu). **B)** Estructura química de 5-FU y uracilo (Ur).

### 2.6.2.1 Metabolismo de la ribavirina y el 5-FU

La ribavirina es convertida en ribavirina-5'-monofosfato (RMP) mediante la acción de la adenosina kinasa (Willis y col. 1978). La RMP es convertida a su vez en ribavirina-5'-trifosfato (RTP) mediante acciones sucesivas de enzimas mono- y di-fosfato kinasas (Gallois-Montbrun y



col. 2003). El proceso de fosforilación tiene lugar de forma rápida de manera que tras unas pocas horas de tratamiento con ribavirina los valores de RTP intracelulares alcanzan concentraciones similares a las del ATP y GTP presentes en condiciones fisiológicas (Page & Connor 1990).

En el caso del 5-FU, este compite con el uracilo por su incorporación en las rutas metabólicas celulares. La principal vía de transformación del 5-FU es su conversión a 5-fluorouridina-5'-monofosfato (FUMP), que a su vez se fosforila mediante las nucleótido kinasas para dar lugar a 5-fluorouridina-5'-difosfato (FUDP), que a su vez vuelve a fosforilarse produciendo FUTP, o puede convertirse en 5-fluorodeoxiuridina-5'-difosfato (FdUDP). Este último, puede fosforilarse o desfosforilarse para dar lugar a FdUTP o FdUMP, respectivamente.

#### **2.6.2.2 Mecanismo de acción de la ribavirina y el 5-FU**

La ribavirina compite con la adenina y la guanina, apareando tanto con citosina como con uracilo. Se ha visto que reduce la síntesis de DNA, RNA y proteínas en las células tratadas (Muller y col. 1977), actuando como agente antiviral para un gran número de virus. Algunos de los mecanismos por los que produce esta reducción en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas son: inhibición de la inosín-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) (Streeter y col. 1973), inhibición directa de la polimerasa viral (Fernández-Larsson y col. 1989, Maag y col. 2001, Toltzis y col 1988, Vo y col. 2003, Wray y col. 1985), y presencia de actividad mutagénica directa. Esta actividad mutagénica se debe a su incorporación por las RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRp) durante la síntesis del RNA viral, produciendo alteraciones en los niveles de NTPs y causando apareamientos de base incorrectos inducidos por el RTP (Crotty y col. 2000, Day y col. 2005, Landford y col. 2001, Sierra y col. 2007).

En el caso de los fluoronucleótidos, como el FdUTP y el FUTP, estos pueden incorporarse durante la replicación viral tanto en el DNA (Dragun y col. 1990) como en el RNA (Gordon & Staehelin 1959) respectivamente, lo que hace que el 5-FU actúe como un agente antiviral contra un gran número de virus. La incorporación de 5-FU en el RNA produce la inhibición del rRNA (Ghoshal & Jacob 1994, 1997) y del tRNA (Randerath y col. 1983, Santi & Hardy 1987), y altera el procesamiento y la estructura secundaria de los precursores de mRNA (Carrico y Glazer 1979, Lenz y col. 1994).

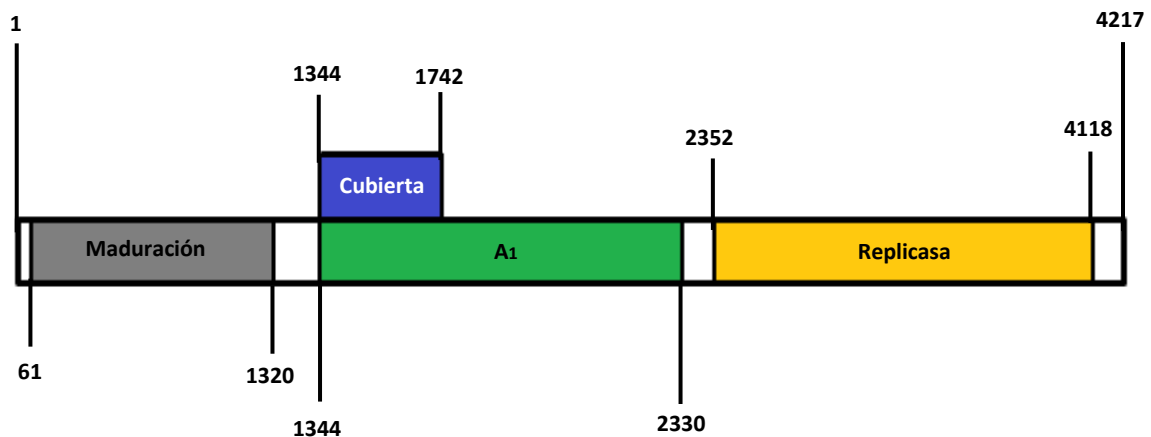
## 2.7 EL BACTERIÓFAGO Q $\beta$ COMO MODELO DE EVOLUCIÓN A ALTA TASA DE ERROR

Desde su descubrimiento (D'Herelle 1917), los bacteriófagos han sido una potente herramienta que ha ayudado a entender los procesos genéticos celulares. Además, los estudios con fagos permiten una gran versatilidad a la hora de realizar experimentos, debido a que no se necesitan medidas especiales de seguridad para su manejo y a la facilidad de su propagación. Por esta razón, los bacteriófagos nos han permitido estudiar en detalle diferentes aspectos del proceso evolutivo. En esta Tesis Doctoral, el bacteriófago Q $\beta$  ha sido el modelo escogido para estudiar los cambios genotípicos y fenotípicos que tienen lugar a tasa de error incrementada de forma artificial.

### 2.7.1 Características generales del bacteriófago Q $\beta$

El bacteriófago Q $\beta$  es un virus RNA de la familia Leviviridae, que pertenece al grupo III del género Allevivirus. Presenta una cápsida icosaédrica de simetría T = 3, con un tamaño de 25 nm de diámetro. Al igual que sucede en otros virus RNA, las poblaciones constituidas por el bacteriófago Q $\beta$  no poseen una secuencia genómica única y definida, sino que están formadas por un gran número de genomas con estructura de cuasiespecie. El bacteriófago Q $\beta$  fue el primero en el que se descubrió la gran heterogeneidad genética de los virus RNA, mediante el análisis sistemático de clones individuales (Domigo y col. 1978).

El material genético de este virus está formado por una molécula de RNA de cadena sencilla (ssRNA) y polaridad positiva que puede actuar como mRNA. Tiene una longitud de 4217 nucleótidos y codifica para cuatro proteínas (Weissmann 1974, Weissmann y col. 1973). La proteína de maduración, A2, codificada por la región comprendida entre los nucleótidos 61 y 1320, es necesaria para la formación de los nuevos viriones y también está implicada en la lisis celular. La proteína de cubierta, cuyo gen se sitúa entre los nucleótidos 1344 y 1742, es la proteína mayoritaria de la cápsida. La lectura errónea del codón de terminación UGA de esta proteína da lugar a la síntesis de una proteína denominada *readthrough* o A1 que está codificada por 588 nucleótidos adicionales (Hofstetter y col. 1974, Weiner y Weber 1971). Por último, el gen que codifica para la proteína replicasa, encargada de la replicación del RNA viral, está localizado al final del genoma, desde el nucleótido 2352 hasta el 4118 (**Figura 2.8**).

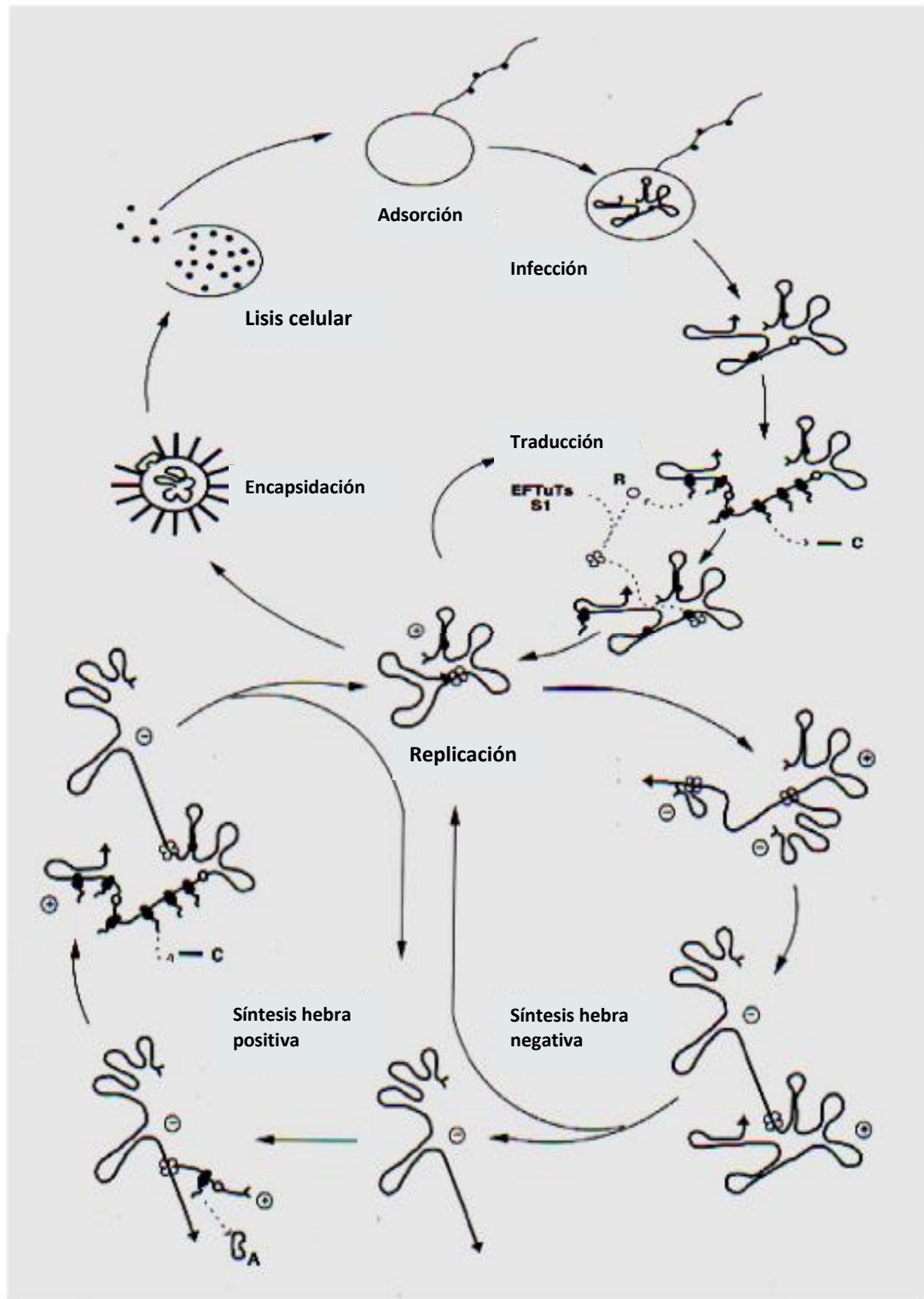


**Figura 2.8. Mapa genético del bacteriófago Qβ.** Se indican los genes que codifican para las cuatro proteínas virales, con el nucleótido de inicio y final para cada gen.

El hospedador natural del bacteriófago Qβ son las cepas *F+* de *E.coli*, y por tanto este virus está incluido en el grupo de los colifagos. Los colifagos de ssRNA fueron descritos por primera vez por Tim Loeb y Norton Zinder (Loeb y Zinder 1961) como resultado de la búsqueda de fagos cuyo ciclo dependiera de la infección en *E.coli*. Como se ha mencionado anteriormente, las tasas de error de los virus RNA son las más altas encontradas en la naturaleza, y en el caso del bacteriófago Qβ la tasa de mutación se ha estimado en torno a  $1,4 \times 10^{-4}$  s/n/r (Bradwell y col. 2013).

### 2.7.2 Ciclo de infección viral

El ciclo de infección del bacteriófago Qβ (**Figura 2.9**) comprende tres procesos: i) adsorción a la célula hospedadora, ii) síntesis de nuevas moléculas de RNA y proteínas virales y iii) liberación de la progenie viral (García-Villada y Drake 2013, Tsukada y col. 2009).



**Figura 2.9. Ciclo de infección y replicación del bacteriófago Qβ.** R = replicasa, C = proteína de cubierta, A = proteína de maduración. Imagen adaptada de Biebricher y Eigen 1987.

### ***Adsorción y entrada***

El proceso de infección del bacteriófago Q $\beta$  tiene lugar a través del *pili*, adsorbiéndose el virus a éste a través de la proteína de maduración. En el momento en el que se produce el contacto, la proteína se escinde en dos fragmentos y permite la liberación del material genético dentro de la célula bacteriana. Uno de los mecanismos por los que se piensa que tiene lugar este proceso es mediante la contracción del *pili* bacteriano al interior celular, introduciendo consigo el RNA viral (Van Duin y Tsareva 2006).

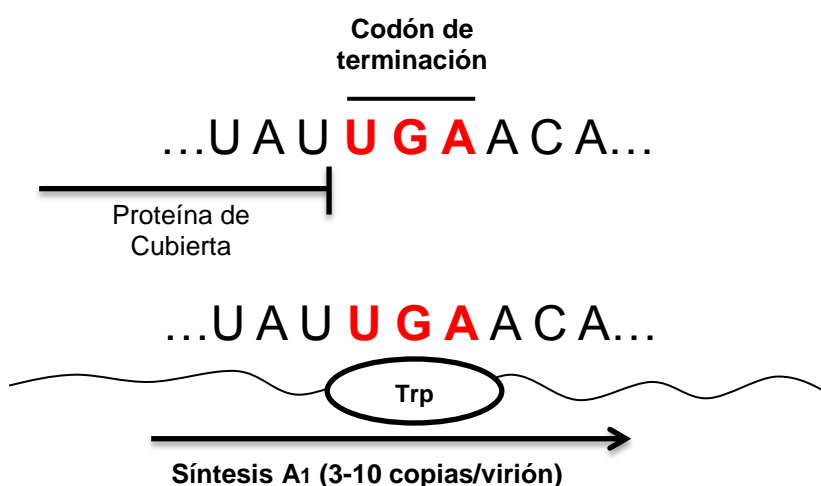
### ***Síntesis de proteínas virales***

Cuando el material genético del bacteriófago Q $\beta$  penetra dentro de la célula hospedadora, la molécula de RNA sirve de molde para la síntesis de las proteínas virales necesarias para la formación de los nuevos viriones. Este proceso de traducción del RNA se encuentra altamente regulado, tanto por la estructura secundaria del RNA, como por la unión a sitios específicos en el RNA de la proteína de cubierta, la polimerasa y posiblemente la proteína de maduración. La estructura secundaria de la molécula de RNA engloba en su interior las regiones iniciales de los genes de lisis y de la replicasa, permaneciendo estable e impidiendo la unión de los ribosomas. En la molécula de RNA los ribosomas solo son capaces de unirse al sitio de inicio del gen de la proteína de cubierta. La traducción de los genes de la proteína de lisis y de la replicasa solo comenzará una vez que la proteína de cubierta está siendo traducida (Van Duin y Tsareva 2006).

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína A1 comparte el mismo codón de inicio de la proteína de cubierta, aunque su nivel de expresión, debido a la incorporación errónea de un triptófano en el lugar del codón de terminación de la proteína de cubierta, es solo de aproximadamente el 5% (**Figura 2.10**) (Hofstetter y col. 1974). La traducción de estas dos proteínas está acoplada asegurando que cada genoma del fago produce el número de copias correcto de ambas. Este fenómeno de la traducción a través de la lectura errónea de un codón de terminación, que origina las denominadas proteínas *readthrough*, se ha documentado tanto en eucariotas como en procariotas (Kohli y Grosjean 1981, Valle y Morch 1988). En el caso del bacteriófago Q $\beta$ , el virus utiliza este mecanismo para producir pequeñas cantidades de la proteína esencial A1 (Weiner y Weber 1971). En general, este tipo de traducción está mediada por dos tipos de tRNAs: tRNAs supresores y tRNAs no supresores. Los tRNAs supresores pueden reconocer específicamente codones de terminación, alterando la traducción y además pueden estar implicados en la realización de algunas funciones específicas celulares (Hatfield 1985). Los tRNAs no supresores pueden tener la habilidad de

leer codones de terminación aunque con menor eficiencia (Engelberg-Kulka 1981, Geller y Rich 1980). Se ha documentado que las variaciones en el procesamiento y estado de metilación de los tRNAs pueden llevar a una alteración de los niveles de expresión de este tipo de proteínas (Hirashima y col. 1979, Leboy 1971).

El final de la traducción que permite la liberación de los diferentes péptidos proteicos, va a estar mediado por los factores de liberación de la traducción (RF1 y RF2), los cuales reconocen específicamente los codones de terminación (Scolnick y col. 1968). En el caso del bacteriófago Q $\beta$ , la síntesis de la proteína de cubierta termina cuando el ribosoma alcanza el codón de terminación UGA en el mRNA. En este punto, el factor de liberación RF2 reconoce específicamente al codón de terminación e induce la hidrólisis del peptidil-tRNA liberando el péptido completo (Capecci 1967, Petry y col. 2005, Petry y col. 2008). La afinidad relativa del factor de liberación y los tRNAs por el codón de terminación es lo que condiciona la lectura errónea de este. Otro factor importante que regula esta afinidad es la secuencia nucleotídica situada en la posición 3' del codón de terminación en cuestión (Li y Race 1993). Este fenómeno ha sido ampliamente documentado en sistemas procarióticos, donde el nucleótido inmediatamente posterior al codón de terminación es el más influyente (Bossi y Roth 1980, Colby y col. 1976, Feinstein y Altman 1978, Fluck y col. 1977, Salser 1969, Yahata y col. 1970).

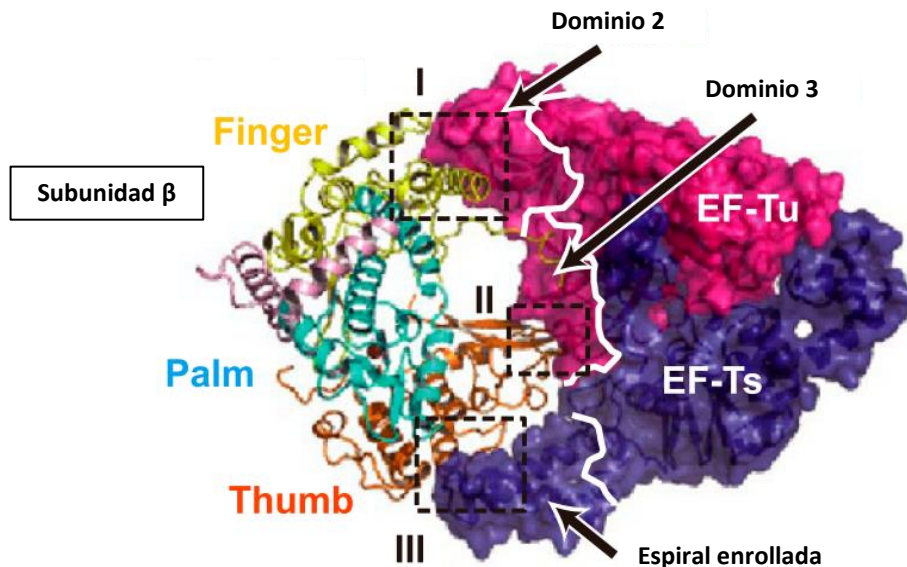


**Figura 2.10. Esquema de la expresión de las proteínas de cubierta y A1.** Cuando el codón de terminación UGA de la proteína de cubierta es leído erróneamente como triptófano se produce la síntesis de la proteína A1.

### **Replicación y síntesis de nuevas moléculas de RNA**

Una vez que la replicasa (subunidad  $\beta$  de la polimerasa) se ha sintetizado, se ensambla con tres proteínas de la bacteria hospedadora (proteína ribosomal S1 y los dos factores de elongación de la traducción EF-Tu y EF-Ts) para formar la polimerasa activa que puede empezar a generar nuevas copias del RNA viral. Este proceso está altamente regulado, de manera que cuando la molécula de RNA comienza a traducirse se impide que tenga lugar la replicación, y viceversa. La polimerasa se une al RNA a través de dos posiciones internas, llamadas sitio S y sitio M. La unión al sitio S, situado al inicio del gen de la proteína de cubierta, impide la unión de los ribosomas, evitando así que tenga lugar la traducción del gen. De esta manera la polimerasa comenzará a copiar el RNA. La hebra positiva da lugar a la hebra negativa, la cual será usada como molde para producir nuevas hebras positivas. Aunque ambas hebras (positiva y negativa) son totalmente complementarias, no se alinean como doble hebra debido al alto grado de plegamiento de las estructuras secundarias y terciarias de cada una de ellas (Axelrod y col. 1991, Biebricher y col. 1984, Skripkin y Jacobson 1993).

La replicasa del bacteriófago Q $\beta$  presenta regiones altamente conservadas en todas las replicasas de los bacteriófagos que llevan RNA como material genético. Estas regiones son esenciales para la correcta función de la proteína (Mills y cols. 1988, Mills y cols. 1990). La subunidad  $\beta$  está compuesta por tres dominios funcionales: *finger*, *thumb* y *palm*, al igual que otras RdRps (Ferrer-Orta y col. 2006) (**Figura 2.11**). El dominio *finger* está compuesto por 4 láminas  $\beta$  antiparalelas y 6 hélices  $\alpha$  y contiene un subdominio altamente conservado. El dominio *thumb* comprende un haz de hélices  $\alpha$  y tres láminas  $\beta$  antiparalelas. Ambos dominios están conectados por un bucle hélice-hélice (HLH) y láminas  $\beta$  antiparalelas. Como resultado, el dominio *palm*, el cual está comprendido por 5 láminas  $\beta$  antiparalelas altamente conservadas y flanqueadas por 4 hélices  $\alpha$ , queda rodeado por los otros dos dominios. Mientras que la conexión por láminas  $\beta$  entre los dominios *finger* y *thumb* es común a las diferentes RdRps, la conexión HLH es única de la estructura de la subunidad  $\beta$  de la polimerasa de Q $\beta$  (Kidmose y col. 2010, Takeshita y Tomita 2010).



**Figura 2.11. Estructura cristalizada de la polimerasa viral.** La polimerasa viral está comprendida por los tres dominios que conforman la subunidad  $\beta$  (*thumb*, *palm*, y *finger*, representados en naranja, azul y amarillo respectivamente), la conexión HLH (representada en rosa), y por los dos factores de elongación de la traducción EF-Tu y EF-Ts que se unen a la replicasa a través de las interfaces I, II y III (representadas en cuadrados). Imagen adaptada de Takeshita y Tomita 2010.

### ***Ensamblaje y formación de los viriones***

Una vez que las proteínas virales se han sintetizado y se ha copiado el material genético, se produce la formación de las nuevas partículas virales y la encapsidación del RNA viral. Los viriones están formados por 90 dímeros (180 copias) de la proteína de cubierta, una única copia de la proteína A2 y varias copias de la proteína A1 (entre el 3-7% de las proteínas que forman el virión) que son esenciales para la formación de las nuevas partículas infecciosas (Van Duin 1988).

### ***Lisis celular y liberación de las nuevas partículas virales***

El ciclo de infección termina cuando la proteína implicada en la lisis celular causa el colapso de la pared celular y se produce la liberación de la progenie viral. En el bacteriófago Q $\beta$  la lisis celular está mediada por la proteína de maduración, A2 (Karnik y Billeter 1983, Winter y Gold 1983). Se ha visto que esta proteína inhibe las enzimas MraY y MurA, ambas implicadas en el ensamblaje de la subunidad de repetición que forma parte del peptidoglicano



de la pared celular (Bernhardt y col. 2001, Bernhardt y col. 2002). Este modo de acción es similar al de algunos antibióticos como la penicilina (Van Duin y Tsareva 2006, Walderich y col. 1988).

### **2.7.3 Evolución de poblaciones del bacteriófago Q $\beta$ en presencia de AZC**

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio (Cases-González y col. 2008) mostraron que la propagación del bacteriófago Q $\beta$  en presencia de altas concentraciones de AZC y utilizando tamaños poblacionales reducidos, producía la extinción de la infectividad viral, lo cual estaba asociado con incrementos en la frecuencia de mutación. También se observó que el AZC podía tener un efecto beneficioso en el desarrollo de placas líticas a partir de virus de bajo *fitness*. Para estudiar si el bacteriófago Q $\beta$  era capaz de seleccionar mutantes de resistencia al AZC, este se propagó durante 70 pases seriados en presencia de concentraciones crecientes de este compuesto utilizando tamaños poblacionales elevados (Arribas y col. 2011). En estas condiciones, las poblaciones lograron mantener su infectividad hasta el pase 70, aunque siempre con valores más bajos que las poblaciones no tratadas. El análisis de las secuencias consenso de las poblaciones obtenidas a lo largo de la serie de pases, mostró la fijación de la mutación A1746U que produce el cambio de aminoácido T134S en la proteína A1. También se detectaron varias mutaciones polimórficas entre las que destaca la mutación A2982(G+A), que produce el cambio T210A en una zona altamente conservada de la replicasa viral (Arribas y col. 2011). En esta Tesis Doctoral nos propusimos realizar una caracterización en profundidad de las secuencias consenso y los espectros de mutantes de las poblaciones del bacteriófago Q $\beta$  evolucionadas en presencia de AZC, con el fin de identificar las posibles mutaciones responsables de la resistencia a este compuesto y su mecanismo molecular de acción.

## OBJETIVOS

---

### 3. OBJETIVOS

Los objetivos planteados para la realización de la Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Caracterización genotípica y fenotípica de las poblaciones del bacteriófago Q $\beta$  evolucionadas en presencia de AZC.
2. Estudio del valor selectivo de las mutaciones fijadas o representadas a alta frecuencia en las poblaciones del punto 1.
3. Estudio de las causas de la prolongada presencia como polimorfismos de las mutaciones que tienen valor selectivo en presencia de AZC.
4. Estudio de los mecanismos moleculares por los cuáles las mutaciones en la replicasa, A2982G y U3582C, incrementan la resistencia al AZC en el bacteriófago Q $\beta$ .
5. Estudio del mecanismo molecular por el cual la mutación A1746U localizada en el gen de la proteína A1 incrementa la resistencia al AZC en el bacteriófago Q $\beta$ .

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Bacterias y virus utilizados

#### 4.1.1 Bacterias

El mantenimiento y la propagación del bacteriófago Q $\beta$  se realizó en cultivos de *E.coli* *Hfr* (Hayes) en fase exponencial ( $DO_{600nm} = 0,6 - 0,8$ ). En algunos casos también se utilizó la cepa de *E.coli* supresora de codones UGA, *G240R4* (*fhuA22*, *phoA10*, *phoA7*(UGA), *ompF627*(T2R), *fadL701*(T2R), *relA1*, *pitA10*, *spoT1*, *trpT152*(UGAs), *rrnB-2*, *mcrB1*, *creC510*) (Chan y Garen 1970). Al igual que en el caso anterior, la infección se realizó cuando las bacterias alcanzaron una  $DO_{600nm}$  entre 0,6 y 0,8.

#### 4.1.2 Virus

##### ***Población Q $\beta$ 0***

El bacteriófago Q $\beta$  fue cedido al laboratorio por el Doctor C.K. Biebricher. La población del fago se adaptó a las condiciones de replicación en medio líquido usadas en nuestro laboratorio (Cases-González y col. 2008). Para ello, inicialmente se infectó 1 litro de un cultivo de *E.coli* *Hfr* en fase exponencial a una multiplicidad de infección (moi) de 1 y se incubó a 37° C durante 90 minutos en medio NB. Una alícuota de este cultivo fue usada para realizar una nueva infección de *E.coli* en las mismas condiciones. Este proceso se repitió 5 veces. El cultivo obtenido después del pase número 5 se trató con cloroformo ( $CHCl_3$ ) durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 40 minutos a 8.000 x g. Los virus del sobrenadante se purificaron mediante precipitación con PEG 6000 al 6% y sedimentación diferencial. La población obtenida se denominó Q $\beta$ 0 y se conservó a -80° C en tampón del fago y glicerol al 50%.

##### ***Clones biológicos***

Los sobrenadantes virales se plaquearon en agar semisólido a una dilución suficiente como para obtener placas de lisis aisladas (ver apartado 4.2.1.1), las cuales, puesto que proceden de la replicación de un único virus, pueden considerarse clones biológicos. Los virus contenidos en las placas de lisis se extrajeron recogiendo el agar ocupado por cada placa que se transfirió a un tubo *Eppendorf* que contenía 50  $\mu$ l de  $CHCl_3$  y 1 ml de tampón del fago. Después de incubar durante 1 hora a 28° C con agitación (300 rpm), se centrifugó 15 minutos a 12.000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo que contenía 25  $\mu$ l de  $CHCl_3$ .

**Mutantes infecciosos**

El plásmido pBRT7Q $\beta$ , el cual contiene el cDNA del bacteriófago Q $\beta$  clonado en el plásmido pBR322 (Barrera y col. 1993), fue usado para expresar el genotipo salvaje (Q $\beta$ wt) y diferentes virus mutantes que contienen mutaciones específicas (**Tabla 4.1**). Las mutaciones se introdujeron mediante la técnica de mutagénesis dirigida descrita en el apartado 4.3.

**Tabla 4.1. Mutantes infecciosos creados por mutagénesis dirigida.**

Mutante infeccioso	Gen mutado	Cambio de aminoácido
Q $\beta$ wt	-	-
Q $\beta$ A1746U	A <sub>1</sub>	T/S
Q $\beta$ A1746G	A <sub>1</sub>	T/A
Q $\beta$ A2982G	Replicasa	T/A
Q $\beta$ A1746U+A2982G	A <sub>1</sub> + Replicasa	T/S + T/A
Q $\beta$ C3413G	Replicasa	-
Q $\beta$ U3582C	Replicasa	Y/H
Q $\beta$ A1746U+U3582C	A <sub>1</sub> + Replicasa	T/S + Y/H
Q $\beta$ G3945A	Replicasa	G/S
Q $\beta$ U3989C	Replicasa	-

## 4.2 Procedimientos generales de infección

### 4.2.1 Infección en medio líquido y realización de pases seriados

Los cultivos de *E.coli* Hfr en fase exponencial se infectaron con el virus a la moi deseada para cada experimento. Después de 2 horas de incubación a 37° C y 200 rpm en medio NB, los cultivos se trataron con 1/20 Vol. de CHCl<sub>3</sub> durante 15 minutos a 37° C y 600 rpm. A continuación se centrifugaron durante 10 minutos a 12.000 rpm y los sobrenadantes se recogieron en un nuevo tubo que contenía 1/40 Vol. de CHCl<sub>3</sub>. Los sobrenadantes se mantuvieron a 4° C para ser usados en un periodo inferior a 10 días, o se congelaron a -80° C para su almacenamiento. Para la realización de los experimentos de evolución viral a través de pases seriados el sobrenadante obtenido después de un ciclo de infección como el descrito, fue utilizado para infectar un nuevo cultivo de *E.coli* en fase exponencial a la multiplicidad de infección deseada. Este proceso se repitió el número de veces (número de pases) indicado en cada experimento.

#### 4.2.1.1 Determinación del título viral

La titulación de los sobrenadantes virales se llevó a cabo mezclando 300 µl de bacterias *E.coli Hfr* en fase exponencial con 100 µl de la suspensión del virus en un volumen de entre 3 y 5 ml de agar semisólido atemperado a 45° C. La mezcla se vertió sobre una placa de Petri con LB agar sólido y se incubó durante toda la noche a 37° C. El título viral, expresado en forma de unidades formadoras de placa (ufp), se estimó como el número de placas de lisis obtenido multiplicado por el factor de dilución empleado.

#### 4.2.2 Pases placa a placa

El sobrenadante conteniendo los virus procedentes de una placa de lisis aislada (ver apartado 4.1.2) fue plaqueado en agar semisólido de modo que se pudieran obtener nuevas placas de lisis cuyos virus fueron utilizados para realizar otro plaqueo en las mismas condiciones. El proceso se repitió durante el número de pases indicado en el texto.

#### 4.3 Obtención de clones infecciosos mediante mutagénesis dirigida

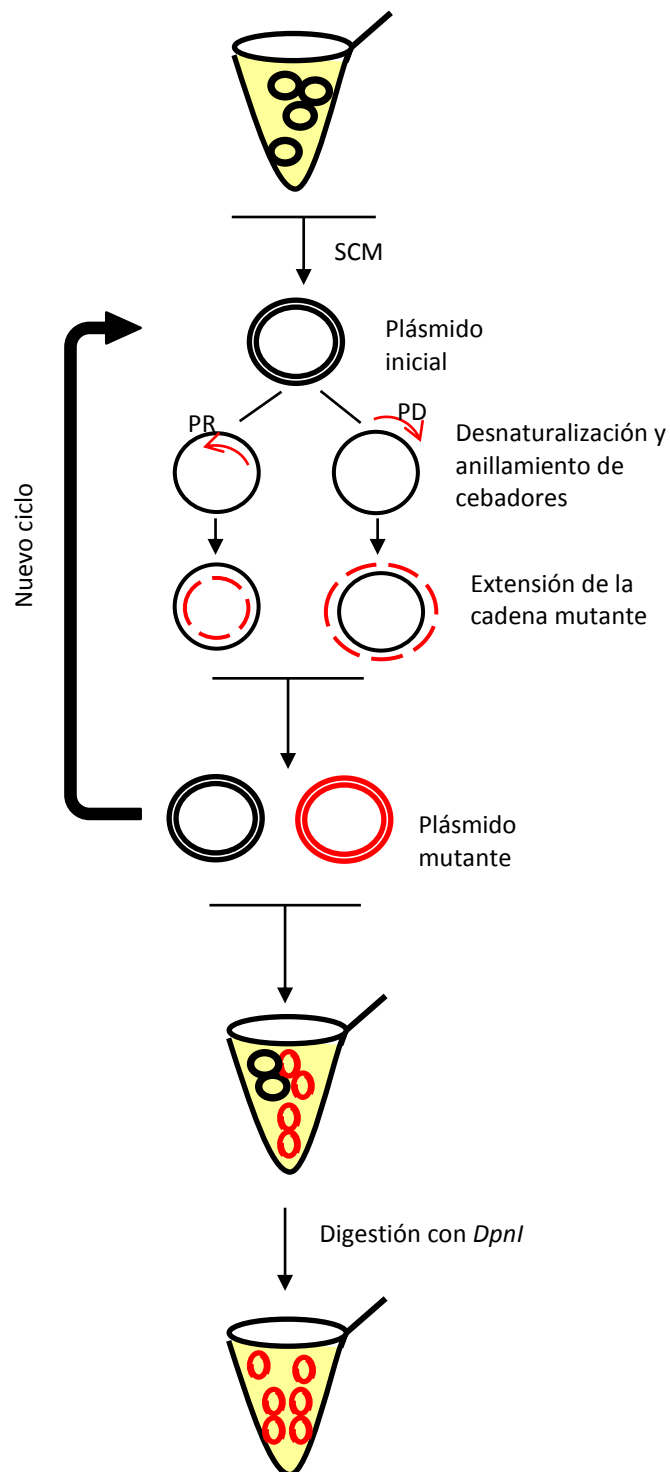
El proceso de mutagénesis dirigida se llevó a cabo mediante el *Kit QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)*. La síntesis de la cadena mutante (SCM) (**Figura 4.1**) se realizó mediante la introducción de diferentes parejas de cebadores específicas para cada una de las siguientes sustituciones: A1746U, A2982G, C3413G, U3582C, G3945A y U3989C (**Tabla 4.2**). El producto resultante se digirió con la enzima *DpnI* y se utilizó para transformar por choque térmico células competentes *DH5-α* (F-,  $\phi$ 80lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF), U169, recA1, endA1, hsdR17 (rk-, mk+) poa,supE44, λ-, thi-1, gyrA96, relA1) (Woodcock y col. 1988). Las colonias positivas se crecieron durante toda la noche a 37° C con 250 rpm de agitación. Los cultivos resultantes se plaquearon en agar semisólido para la obtención de placas de lisis correspondientes a clones biológicos del virus que llevan incorporada la mutación deseada (mutantes infecciosos). Cada uno de los experimentos llevados a cabo con mutantes infecciosos fue iniciado con una única placa lítica cuya secuencia fue previamente analizada para comprobar la presencia de la mutación deseada.

Tabla 4.2. Cebadores utilizados para la generación de mutantes infecciosos del bacteriófago Q $\beta$ .

Mutante infeccioso	Secuencia genética de los oligonucleótidos <sup>1</sup>
Q $\beta$ A1746U	5'GAACCCAGCGTATTGATCACTGCTCATTGCCGG3' 5'CCGGCAATGAGCAGTGATCAATACGCTGGGTTTC3'
Q $\beta$ A1746G	5'GAACCCAGCGTATTGAGCACTGCTCATTGCCGG3' 5'CCGGCAATGAGCAGTGCTCAATACGCTGGGTTTC3'
Q $\beta$ A2982G	5'GCCCTTTTAAATAAGCAGTTGCTGTACCTAAGAACAGTAAGAC3' 5'GTCTTACTGTTCTTAGGTACAGCAACTGCTTTATTAAGGGG3'
Q $\beta$ C3413G	5'CTTAGACTCGTCTGAGGTGACTGTTTACGGAGACGA3' 5'TCGTCTCCGTAAACAGTCACCTCAGACGAGTCTAAG3'
Q $\beta$ U3582C	5'CGTAGATGTTACTCCCTTTCACATACGTCACCGTATAG3' 5'CTATACGGTGACGTATGTGAAAGGGAGTAACATCTACG3'
Q $\beta$ G3945A	5'CCTCTTAGGGGTCCATCGAGTTGCGATTCTGCCGG3' 5'CCGAGAATCGCAACTCGATGGACCCCTAAGAGG3'
Q $\beta$ U3989C	5'CCATCGATCAGCTTATCTGCAGGAGTAATCCTACGAAG3' 5'CTTCGTAGGATTACTCCTGCAGATAAGCTGATCGATGG3'

<sup>1</sup> Secuencia genética de los cebadores directos y complementarios que introducen por mutagénesis dirigida cada una de las mutaciones específicas. Los nucleótidos marcados corresponden al nucleótido mutado localizado en la posición específica del genoma donde se quiere introducir la mutación.





**Figura 4.1. Síntesis de la cadena mutante del plásmido conteniendo la mutación específica introducida en el genoma viral.** El plásmido inicial conteniendo el genoma del virus, se desnaturaliza y tras el anillamiento de los cebadores mutados (PD, primer directo y PR, primer reverso), se sintetiza la cadena que contiene la mutación deseada mediante la enzima *PfuUltra DNA Polymerase*. Posteriormente la enzima *DpnI* digiere las hebras parentales metiladas y hemimetiladas.

#### 4.4 Evolución experimental

##### 4.4.1 Obtención de poblaciones virales del bacteriófago Q $\beta$ evolucionadas en presencia de concentraciones crecientes de AZC

La población Q $\beta$ 0 se utilizó para establecer dos líneas evolutivas diferentes, una en ausencia de mutágeno (Q $\beta$ control) y la otra en presencia de concentraciones crecientes de AZC (Q $\beta$ AZC) (Arribas y col. 2011). Ambas líneas se iniciaron infectando cultivos de *E.coli Hfr* en fase exponencial en un volumen de 10 ml a una moi de 1. Después de 2 horas de incubación a 37° C y agitación (200 rpm), se recogieron los sobrenadantes y 1 ml de cada suspensión del fago fue usada para infectar un nuevo cultivo de *E.coli Hfr* en fase exponencial. El proceso se repitió durante 90 pases. El número de pases experimentados por el virus a cada concentración de AZC se muestra en la **Tabla 4.3**. Las poblaciones obtenidas cada 10 pases fueron tituladas y se nombraron indicando el número de pase y la máxima concentración de AZC a la que habían sido expuestas.

**Tabla 4.3. Concentración de AZC y número de pases realizados para la línea evolutiva Q $\beta$ AZC.**

Concentración de AZC	Pases realizados <sup>1</sup>
10 $\mu$ g/ml	p1 – p20
20 $\mu$ g/ml	p21 – p30
30 $\mu$ g/ml	p31 – p40
50 $\mu$ g/ml	p41 – p50
60 $\mu$ g/ml	p51 – p60
80 $\mu$ g/ml	p61 – p80
100 $\mu$ g/ml	p81 – p90

<sup>1</sup> Las poblaciones virales comprendidas entre los pases 1 y 70 fueron obtenidas previamente en un estudio realizado en el laboratorio de Evolución Molecular del CAB.

##### 4.4.2 Propagación del bacteriófago Q $\beta$ en condiciones que favorecen su extinción

Las condiciones que producen la extinción del bacteriófago Q $\beta$  en presencia de AZC fueron establecidas en experimentos previos realizados en nuestro laboratorio (Cases-González y col. 2008). Estas condiciones consisten en la infección de 10<sup>8</sup> bacterias *Hfr* en fase exponencial con 10<sup>6</sup> ufp del virus en un volumen de 1 ml conteniendo la cantidad de AZC deseada (80  $\mu$ g/ml). Después de 2 horas de incubación a 37° C, los cultivos se tratan con CHCl<sub>3</sub>.

tal y como se indica en el apartado 4.2.1 y 100 µl del sobrenadante se utilizan para iniciar un nuevo pase.

## **4.5 Caracterización genética de las poblaciones del bacteriófago Q $\beta$**

### **4.5.1 Extracción de RNA**

La extracción de RNA del fago se realizó tanto de las poblaciones evolucionadas a través de pases seriados (para obtener la secuencia consenso), como de los clones biológicos aislados de las mismas (para caracterizar el espectro de mutantes). A partir de 400 µl de los sobrenadantes virales se añadieron 4 µl de SDS 10%, 4 µl de  $\beta$ -mercapto etanol (50%) y 1 µl de *RNAsina* (inhibidor de ribonucleasas). Después de incubar 20 minutos a temperatura ambiente las muestras se enfriaron 5 minutos en hielo y se les añadió 1 Vol. de fenol frío saturado con agua. Después de agitar y centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm a 4° C se tomaron 200 µl de la fase acuosa y se precipitaron con etanol mediante procedimientos estándar. El RNA se resuspendió en 20 µl de agua ultra pura (tratada con DEPC) y se guardó a -80° C para su conservación.

### **4.5.2 Obtención de cDNA y amplificación por PCR**

El proceso de PCR consiste en la amplificación de una secuencia de nucleótidos determinada a partir de dos cebadores seleccionados (Saiki y col. 1988). Estos cebadores se alinean con secuencias específicas de la molécula de DNA y permiten la amplificación de la región comprendida entre ambos. En el caso del RNA, previo al paso de amplificación es necesario retro-transcribir el RNA a cDNA. El proceso de retrotranscripción se llevó a cabo utilizando la enzima *AMV Transcriptasa Reversa* (*Promega*) obtenida de partículas virales del virus de la mieloblastosis aviar. El cDNA obtenido se amplificó mediante el sistema *Expand High Fidelity System RT-PCR*.

#### ***Cebadores para la amplificación de regiones del genoma por PCR***

A lo largo de la Tesis Doctoral el genoma del fago se ha amplificado mediante la utilización de cuatro parejas de oligonucleótidos (**Tabla 4.4**). La amplificación consistió en un programa de 40 ciclos de desnaturalización a 94° C y de anillamiento a la temperatura específica para cada pareja de cebadores (P6-P7: 56,8° C; P8-P9: 59,4° C; PD5-PR3: 55° C y PD5-PR12: 55,2° C).

**Tabla 4.4. Secuencia genética de los cebadores utilizados para amplificar el genoma del bacteriófago Q $\beta$  mediante PCR.**

Región amplificada <sup>1</sup>	Nombre y secuencia genética del cebador <sup>2</sup>	
150 – 1500	P6 (D)	5'CGAATCTTCCGACACGCATCC3'
	P7 (R)	5'CTGGAGAAGCGTGTACCGTTT3'
1410 – 2820	P8 (D)	5'CTCAATCCGCGGTGGGGTAAATCC3'
	P9 (R)	5'TGTTGCGTCACTGCCGATTTTCTG3'
2150 – 4090 (PR3) 2150 – 4200 (PR12)	PD5 (D)	5'GTGCCATACCGTTTGACT3'
	PR3 (R)	5'GGTCTTCCAGGGCACGA3'
	PR12 (R)	5'ACGAGTGAGAGGGGGATC3'

<sup>1</sup> La región de nucleótidos amplificada por PCR comprende desde el primer nucleótido del cebador directo hasta el último nucleótido del cebador inverso. En el caso de haber varios cebadores inversos que difieran en la región amplificada se indica el nombre del cebador entre paréntesis.

<sup>2</sup> Se indica si el cebador es directo (D) o inverso (R).

#### 4.5.3 Purificación y cuantificación del producto de PCR

El producto amplificado por PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (1% TAE) y posterior visualización en un transiluminador de UV. La purificación del producto de PCR se realizó mediante el *Kit* de purificación *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). En el caso de que aparecieran bandas inespecíficas se recortó la banda del tamaño adecuado del gel de agarosa y el cDNA se extrajo utilizando el *Kit QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). La concentración del cDNA se determinó en un Nanodrop (*Applied Biosystems, Veriti*).

#### 4.5.4 Secuenciación del cDNA y análisis de las secuencias

La secuenciación del cDNA purificado se realizó mediante el método de *Sanger* utilizando un secuenciador automático *Abi 3730 XL* (*Applied Biosystems, Perkin-Elmer*) con el *Big Dye Terminator v3.1 Kit*. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de secuenciación se muestran en la **Tabla 4.5**. Las secuencias obtenidas se ensamblaron con el programa *DNAStar Lasergene 8* y se alinearon con el programa *CLUSTAL X*. Una vez alineadas, las secuencias se compararon con respecto a la secuencia consenso del bacteriófago Q $\beta$  salvaje utilizando el programa *BioEdit* para detectar las posibles mutaciones puntuales. Todas las mutaciones identificadas de este modo fueron comprobadas utilizando el programa *Chromas* que permite visualizar los cromatogramas.

Tabla 4.5. Secuencia genética de los cebadores utilizados para secuenciar el genoma del bacteriófago Q $\beta$  mediante el método de *Sanger*.

Región amplificada	Nombre y secuencia genética del oligonucleótido <sup>1</sup>	
150 – 1500 (P6 – P7)	Psc1 (D)	5'TGTTGAACGCCACCTTGATGAT3'
	Psc2 (D)	5'TGGCAGAACCGTCATGATAAGATT3'
	P10 (D)	5'GCAATCTTCGGTTCGCTACACTA3'
1410 – 2820 (P8 – P9)	Psc3 (D)	5'CGTTGCCTCGCTTTCACA3'
	PD5 (D)	5'GTGCCATACCGTTTGAAT3'
	Pcl1R (R)	5'GTAACTAAGGATGAAATGCA3'
2150 – 4090/4200 (PD5 – PR3/PR12)	PD4 (D)	5'CGAAGCTGTTGCCTGGGAGAAGTT3'
	PD10 (D)	5'CCAACTGGGTATCGGTGGCAATTCTA3'
	Psec6 (D)	5'CCTGATGGTTACGGTGATGG3'
	PR12 (R)	5'ACGAGTGAGAGGGGGATC3'

<sup>1</sup> Se indica si el oligonucleótido es directo (D) o inverso (R).

#### 4.5.5 Determinación de la frecuencia de mutación

La frecuencia de mutación mínima se calculó como el número de mutaciones diferentes presentes en los clones analizados dividido por el total de nucleótidos secuenciados. La frecuencia de mutación máxima se calculó como el número de mutaciones totales dividido por el número total de nucleótidos secuenciados. Ambas frecuencias se determinaron utilizando clones biológicos aislados de las diferentes poblaciones de estudio.

#### 4.6 Caracterización fenotípica de las poblaciones del bacteriófago Q $\beta$

##### 4.6.1 Ensayos de inhibición de la replicación viral en presencia de diferentes agentes mutagénicos, no mutagénicos e hipometilantes

Los ensayos se realizaron infectando 10<sup>8</sup> bacterias *E.coli* *Hfr* con 10<sup>4</sup> ufp de cada virus de estudio en presencia de los diferentes agentes cuyo efecto se quería determinar. Los diferentes agentes mutagénicos fueron: AZC, dAZC, 5-FU y Rib; los no mutagénicos: Cy, Ur, Gu y Ad; y los hipometilantes: S-adenosil-L-homocisteína (SAH), acetato de magnesio

(Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>) y acetato de amonio (NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO). Las concentraciones añadidas de cada compuesto se detallan en cada experimento. Todos los ensayos se llevaron a cabo en un volumen de 1 ml y por duplicado. Después de 2 horas de incubación a 37° C y con 200 rpm de agitación, las muestras se trataron como se indica en el apartado 4.2.1, y se determinó el título viral de los sobrenadantes obtenidos. En todos los ensayos se realizó un cultivo control, en las mismas condiciones pero en ausencia de compuesto, que se tomó como valor de referencia.

#### 4.6.2 Determinación de la eficacia biológica (*fitness*)

La tasa de crecimiento viral se utilizó como un estimador del *fitness*. Para determinarla se infectaron 10<sup>8</sup> bacterias con 10<sup>4</sup> ufp del virus estudiado en un volumen de 1 ml. Después de 2 horas de incubación a 37° C y agitación 200 rpm, se recogieron los sobrenadantes (ver apartado 4.2.1) y se titularon. El ensayo se realizó por triplicado, incluyendo en todos los casos un virus de genotipo salvaje como referencia. El *fitness* absoluto se calculó como:

$$Fa = \text{Log}_2 TR$$

donde *TR* es la tasa de replicación del virus, calculada como:

$$TR = \frac{\text{ufp finales}}{\text{ufp iniciales}}$$

El *fitness* relativo se calculó como:

$$FR = \frac{Fa}{FaV}$$

donde *FaV* es el *fitness* absoluto del virus de referencia.

#### 4.6.3 Ensayos de competición entre distintos mutantes del bacteriófago Qβ

Las competiciones entre los distintos clones y mutantes infecciosos del bacteriófago Qβ se llevaron a cabo infectando 10<sup>9</sup> bacterias con cantidades equivalentes de cada virus competidor (**Figura 4.2**). A partir de los sobrenadantes obtenidos después de 2 horas de incubación, se realizaron pases adicionales manteniendo una moi de entre 0,01 y 1 que se detalla en cada experimento. Todas las competiciones se realizaron por duplicado. En todos los casos las poblaciones obtenidas fueron secuenciadas para determinar si alguno de los virus competidores llegaba a ser dominante en el conjunto de genomas de la población.



**Figura 4.2. Ensayos de competición entre los virus del bacteriófago Qβ.** Las competiciones se hicieron infectando  $10^9$  bacterias con cantidades equivalentes de cada virus competidor ( $10^4$  ufp) manteniendo una moi de entre 0,01 y 1. Las poblaciones obtenidas tras la serie de pases realizados se secuenciaron para determinar si alguno de los virus competidores llegaba a ser dominante en la población.

#### 4.6.4 Cuantificación de la entrada del bacteriófago Qβ en *E.coli*

Para cuantificar la entrada del virus en las células bacterianas, se infectaron 3 cultivos de *E.coli* *Hfr* conteniendo  $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  bacterias con  $10^5$  ufp. Cada cultivo se incubó durante 10 minutos a 37° C y 300 rpm de agitación en un volumen final de 1 ml. A continuación se centrifugaron a 4° C durante 5 minutos a 12.000 rpm y se descartaron los sobrenadantes. El *pellet* se lavó 2 veces con medio NB frío y finalmente se resuspendió en 1ml de medio NB. La suspensión resultante se plaqueó para determinar el título viral. Todos los ensayos se hicieron por triplicado. La tasa de adsorción ( $\alpha$ ) se calculó como:

$$N_L = N_t e^{-10\alpha}$$

donde  $N_L$  es el número de partículas libres no adsorbidas,  $N_t$  el número de virus totales y 10 los minutos de incubación (Heineman y Bull 2007). El número de partículas libres  $N_L$  se calculó como la diferencia entre el número de virus totales ( $N_t$ ) menos el número de virus adsorbidos.

## 4.7 Materiales

### 4.7.1 Medios de cultivo y crecimiento

Los medios de cultivo para el crecimiento y el mantenimiento de los virus y bacterias fueron los siguientes:

**NB (Nutrient Broth).** Medio líquido para el crecimiento de *E.coli*.

Nutrient Broth (Merck) 8 g/L

NaCl 5 g/L

**LB (Luria-Bertani).** Medio líquido para el crecimiento de *E.coli*.

Extracto de levadura 5 g/L

Tryptona 10 g/L

NaCl 10 g/L

**Tampón del fago.** Medio líquido para el mantenimiento del bacteriófago Q $\beta$ .

Gelatina 1g/L

Tris-HCl 1M pH = 7,5 - 50mM

MgCl<sub>2</sub> 10mM

**Agar semisólido.** Medio semisólido para el crecimiento en placa del bacteriófago Q $\beta$ .

Nutrient Broth (Merck) 8 g/L

NaCl 5 g/L

Select Agar (Invitrogen) 7 g/L

**LB Agar.** Medio sólido para el crecimiento en placa de *E.coli*.

LB agar (Invitrogen) 32 g/L

#### 4.7.2 Disoluciones y tampones

**PBS (solución salina tamponada con fosfato):** 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.8.

**Solución de IPTG:** isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido 0,5M en agua destilada.

**Solución de X-gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido 2% en dimetilformamida.

**TAE:** 40 mM Tris acetato, pH 8.3, 1 mM EDTA.

**DMSO:** Dimetil sulfóxido

#### 4.7.3 Agentes mutagénicos y nucleósidos

Los agentes mutagénicos empleados fueron 5-azacitidina (AZC) (Sigma), 5-fluorouracilo (5-FU) (Sigma), ribavirina (Rib) (Sigma) y 5-aza-2'-deoxicitidina (dAZC) (Sigma). Los nucleósidos empleados fueron adenosina (Ad) (Sigma), guanosina (Gu) (Sigma), citidina (Cy) (Sigma) y uridina (Ur) (Sigma). Las disoluciones *stock* correspondientes de AZC y 5-FU se prepararon en tampón del fago esterilizado (ver apartado 4.7.1) y se conservaron a 4° C un máximo de 72



horas. La ribavirina se preparó a una concentración de 100 mM en PBS y se conservó a -20° C en alícuotas de un solo uso. La disolución de dAZC se preparó en DMSO y se conservó a 4° C un máximo de 72 horas. Las disoluciones de nucleósidos se prepararon en tampón del fago esterilizado y se conservaron a 4° C un máximo de 72 horas (**Tabla 4.6**).

**Tabla 4.6. Agentes mutagénicos y nucleósidos.**

Compuesto	Concentración stock
AZC	5 mg/ml
dAZC	50 mg/ml
Rib	100 mM
5-FU	5 mg/ml
Ad	50 mg/ml
Gu	50 mg/ml
Cy	50 mg/ml
Ur	50 mg/ml

#### 4.7.4 Agentes hipometilantes

Los agentes hipometilantes empleados fueron SAH (Sigma),  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  (Life Technologies) y  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$  (Applied Biosystems). La disolución *stock* de SAH se preparó en agua miliQ esterilizada y se conservó a -20° C en alícuotas de un solo uso. La disolución de  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  se preparó en agua miliQ estéril y se conservó a temperatura ambiente en alícuotas de 1 ml, al igual que el  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$  listo para su uso (**Tabla 4.7**).

**Tabla 4.7. Agentes hipometilantes.**

Compuesto	Concentración stock
SAH	1 mg/ml
$\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	1 M
$\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$	5 M

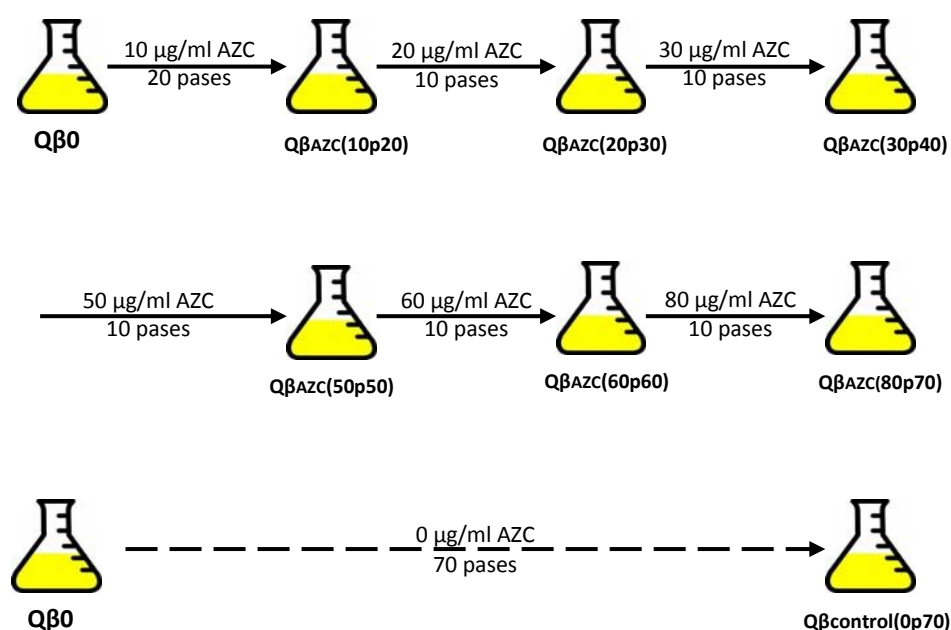
## RESULTADOS

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1 RESULTADOS PREVIOS SOBRE EL EFECTO DEL AZC EN EL BACTERIÓFAGO Q $\beta$

En base a los resultados previos obtenidos (Cases-González y col. 2008) y con el objetivo de ver si el bacteriófago Q $\beta$  era capaz de seleccionar mutantes de resistencia al AZC, la población Q $\beta$ 0 (ver apartado 4.1.2 de Materiales y Métodos) fue propagada por María Arribas en el laboratorio de Evolución Molecular del CAB en presencia de concentraciones crecientes de AZC utilizando tamaños poblacionales elevados (ver apartado 4.4.1 de Materiales y Métodos), según el esquema que se muestra en la **Figura 5.1**. Dado que gran parte de las poblaciones virales analizadas en esta Tesis Doctoral fueron obtenidas en este experimento, hemos considerado conveniente describir con cierto detalle su historia evolutiva, así como algunas de las determinaciones previas realizadas.



**Figura 5.1. Evolución de la población Q $\beta$ 0 en presencia y ausencia de AZC.** La población Q $\beta$ 0 fue usada para iniciar dos series de pasajes en paralelo, una en presencia de concentraciones crecientes de AZC (Q $\beta$ AZC) y la otra en ausencia de mutágeno (Q $\beta$ control). Ambas líneas se iniciaron infectando  $10^9$  bacterias en fase exponencial con  $10^9$  ufp en un volumen de 10 ml. Cada nuevo pase fue iniciado con 1 ml de la suspensión de fagos obtenida en el pase anterior (ver apartado 4.4.1 de Materiales y Métodos). Las poblaciones obtenidas en puntos concretos de cada serie de pasajes se nombraron indicando la máxima concentración de AZC a la que habían sido expuestas, seguido del número de pasajes totales dados a la población (entre paréntesis).

La determinación de los títulos virales cada 10 pases mostró que el virus transmitido en presencia de AZC no se extinguía, incluso después de alcanzar concentraciones de AZC que provocaban la extinción cuando los tamaños poblacionales eran menores (Cases-González y col. 2008). Sin embargo, los títulos de las poblaciones  $Q\beta_{AZC}(60p60)$  y  $Q\beta_{AZC}(80p70)$  ( $5.0 \times 10^9$  y  $5.0 \times 10^8$  ufp/ml, respectivamente) fueron menores que los de las poblaciones control nunca tratadas con mutágeno ( $Q\beta_{control}(0p60) \approx 1.0 \times 10^{11}$  ufp/ml y  $Q\beta_{control}(0p70) \approx 1.0 \times 10^{11}$  ufp/ml) (Arribas y col. 2011).

El análisis de las secuencias consenso de las poblaciones evolucionadas en presencia de AZC mostró en el pase 30 la fijación de la mutación **A2187C** (S281R), y en el pase 40 la fijación de la mutación **A1746U** (T134S), en la proteína A1, además de la presencia de dos mutaciones polimórficas en la replicasa, **G3945(A+G)** (G531S) y **U3989(C+U)** que no produce cambio de aminoácido. En el pase 50 se detectó la presencia de otros dos polimorfismos, **A2982(G+A)**, que produce el cambio T210A en la replicasa y la mutación sinónima **U1520(C+U)** localizada en el gen que codifica para las proteínas de cubierta y A1. Todas estas sustituciones polimórficas son exclusivas de las poblaciones evolucionadas en presencia de AZC y permanecieron como polimorfismos hasta el pase número 70 (Arribas y col. 2011). Por otro lado, el análisis de la secuencia consenso de la población  $Q\beta_{control}(0p70)$  mostró la fijación de la mutación **A2187C**, común en las líneas evolutivas  $Q\beta_{control}$  y  $Q\beta_{AZC}$ , además de la mutación **G1773A** (G143R), exclusiva de la serie de pases evolucionada en ausencia de AZC.

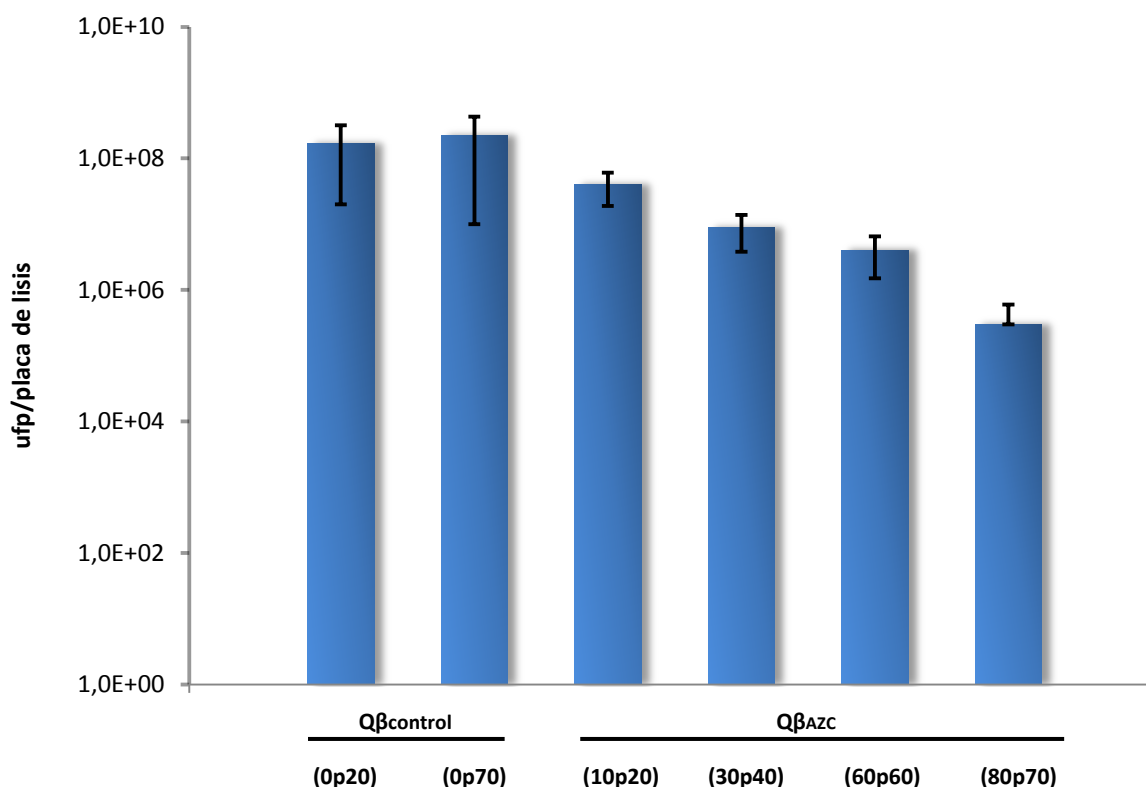
## 5.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES DEL BACTERIÓFAGO $Q\beta$ EVOLUCIONADAS EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE AZC

Las poblaciones obtenidas en diferentes puntos de las series de pases realizadas en presencia y ausencia de AZC (Figura 5.1), fueron analizadas a nivel genotípico y fenotípico con el objetivo de analizar en profundidad el proceso evolutivo seguido por el bacteriófago  $Q\beta$ .

### 5.2.1 Determinación de los títulos de clones biológicos aislados de las poblaciones del bacteriófago $Q\beta$

Para determinar si el descenso en los títulos virales experimentado por las poblaciones pasadas en presencia de AZC (ver apartado 5.1 de resultados) era debido a un descenso en la capacidad replicativa de los virus individuales que componían el espectro de mutantes, se plaquearon en ausencia de AZC tanto las poblaciones  $Q\beta_{control}(0p20)$  y  $Q\beta_{control}(0p70)$  como las poblaciones tratadas con mutágeno  $Q\beta_{AZC}(10p20)$ ,  $Q\beta_{AZC}(30p40)$ ,  $Q\beta_{AZC}(60p60)$  y  $Q\beta_{AZC}(80p70)$ . De cada una estas poblaciones se aislaron placas de lisis y se titularon (**Figura**

5.2). En las condiciones en las que se realizó el plaqueo podemos asumir que cada placa de lisis es originada por la replicación de un único virus y por tanto es posible utilizar el título de las placas como un estimador de la capacidad replicativa del virus fundador.

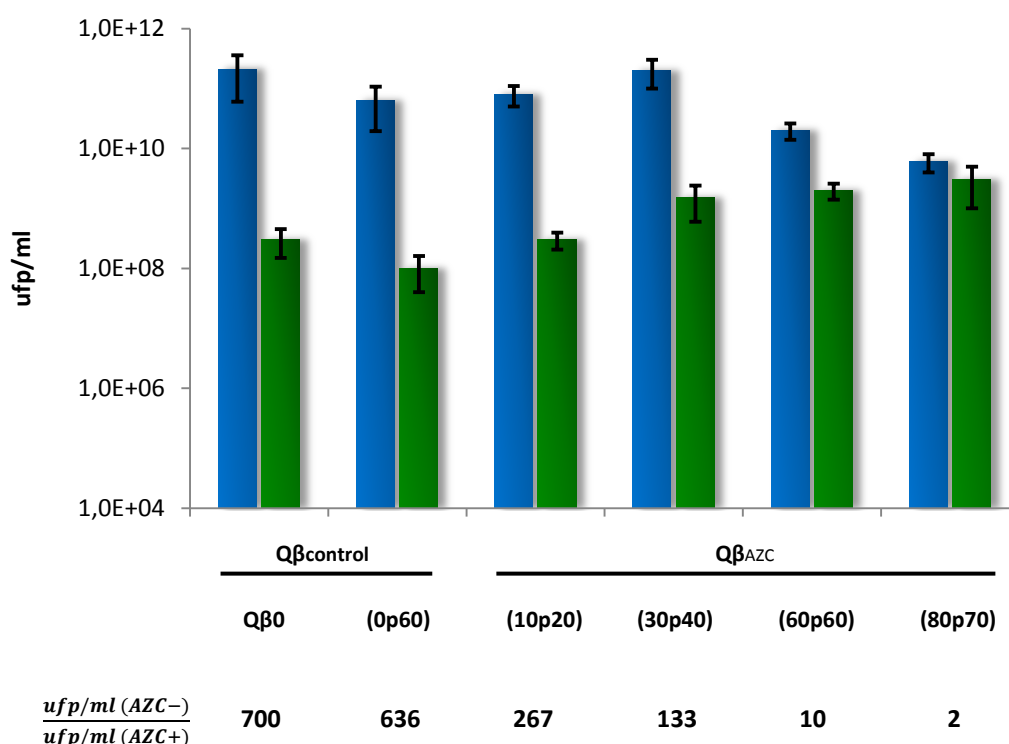


**Figura 5.2. Título promedio de las placas de lisis aisladas de las poblaciones del bacteriófago Qβ propagadas en presencia y ausencia de AZC.** El número de placas de lisis fue 20 para la población Qβcontrol(0p20), 10 para la Qβcontrol(0p70), 6 para la QβAZC(10p20), 7 para la QβAZC(30p40), 12 para la QβAZC(60p60) y 8 para la QβAZC(80p70). Las barras de error representan la desviación estándar de los títulos virales obtenidos para todas las placas de lisis aisladas de cada población. En todos los casos las titulaciones se realizaron por duplicado.

Los resultados mostraron que los títulos de las placas de lisis aisladas de cualquiera de las poblaciones evolucionadas en presencia de AZC eran significativamente más bajos que los de las placas de lisis procedentes de las poblaciones control ( $P < 0,001$  en todas las comparaciones, test t de Student), siendo las placas aisladas de las poblaciones pasadas a altas concentraciones de AZC (QβAZC(60p60) y QβAZC(80p70)) las que presentaban valores menores. Estos resultados sugieren que el descenso en los títulos virales observado durante la evolución en presencia de AZC es debido a una menor capacidad replicativa de los virus que componen el espectro de mutantes de las poblaciones mutagenizadas.

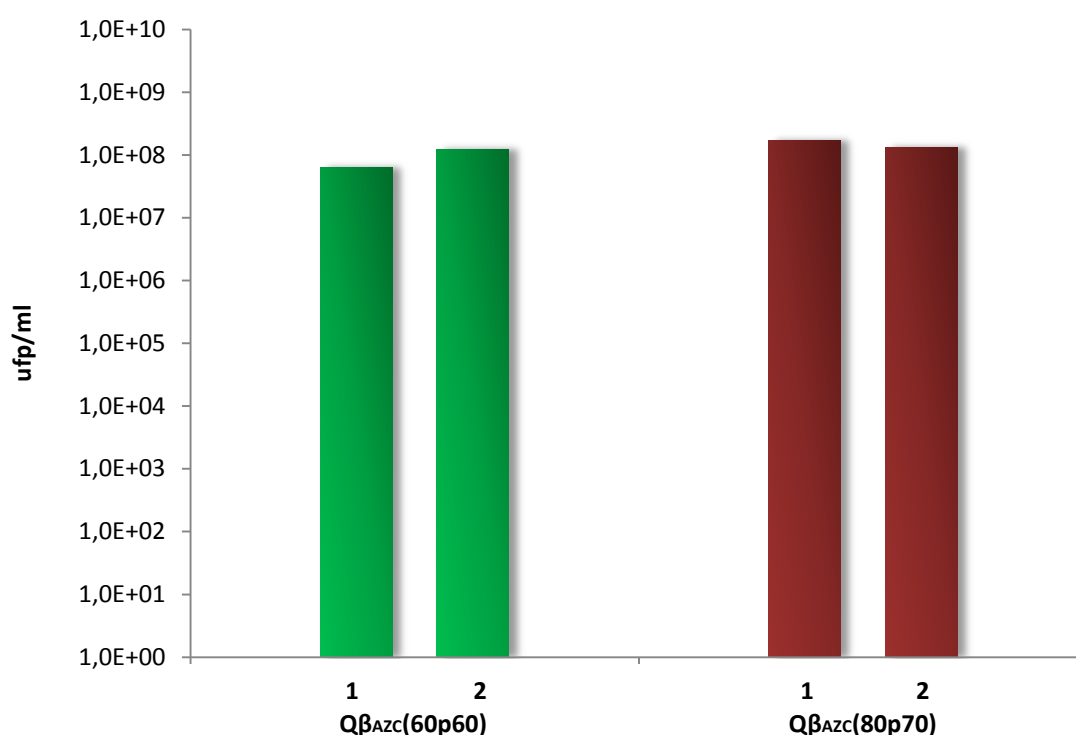
### 5.2.2 Sensibilidad al AZC de las poblaciones del bacteriófago Q $\beta$

Las poblaciones obtenidas a lo largo de las series de pases realizadas en presencia y ausencia de AZC (Figura 5.1) fueron analizadas para evaluar su capacidad de producir progenie infecciosa en presencia de una alta concentración de AZC (80  $\mu\text{g/ml}$ ). Los resultados obtenidos (Figura 5.3) mostraron que todas las poblaciones pasadas en presencia de AZC presentaban mayor tolerancia al mutágeno con respecto a la población Q $\beta$  original (Q $\beta$ 0) y a la población control Q $\beta_{\text{control}}$ (0p60), no expuestas al mutágeno, siendo las poblaciones Q $\beta_{\text{AZC}}$ (60p60) y Q $\beta_{\text{AZC}}$ (80p70) las que presentaban menor sensibilidad al AZC. Además se observó que la relación entre los títulos virales obtenidos en ausencia y presencia de AZC se reduce a medida que aumentan el número de pases y la concentración de mutágeno a la que ha sido expuesta la población. Estos resultados concuerdan con la selección de algún mecanismo de resistencia al AZC a lo largo de la serie de pases realizados en su presencia.



**Figura 5.3. Sensibilidad al AZC de las poblaciones del bacteriófago Q $\beta$  evolucionadas en presencia y ausencia de AZC.** El experimento se llevó a cabo por triplicado infectando  $10^9$  bacterias *E.coli* Hfr en fase exponencial con  $10^8$  ufp de cada población viral en un volumen de 10 ml y en presencia de 80  $\mu\text{g/ml}$  de AZC (columnas verdes) o en su ausencia (columnas azules). Los sobrenadantes de las poblaciones obtenidas se titularon por duplicado para determinar el rendimiento del virus. Las barras de error corresponden al error estándar de la media de los títulos virales. La relación entre los títulos virales obtenidos en ausencia y presencia de AZC se utilizó como medida de la sensibilidad al AZC y se indica en la gráfica debajo del nombre de cada población.

Para determinar si las poblaciones que habían aumentado su tolerancia al AZC en un único pase también presentaban mayor resistencia a la extinción después de un tratamiento más prolongado, estas se propagaron durante 10 pases seriados en condiciones que producían la extinción del virus salvaje (80  $\mu\text{g/ml}$  de AZC y tamaños poblacionales reducidos) (Cases-González y col. 2008). Los resultados mostraron que las poblaciones  $Q\beta_0$  y  $Q\beta_{\text{control}}(0\text{p}70)$  se extinguieron a pases 6 y 5 respectivamente, mientras que las poblaciones  $Q\beta_{\text{AZC}}(60\text{p}60)$  y  $Q\beta_{\text{AZC}}(80\text{p}70)$  mantuvieron títulos altos al menos hasta el pase número 10 (**Figura 5.4**). Los títulos a pase número 10 de todas las poblaciones pasadas en ausencia de AZC fueron similares (en torno a  $10^{11}$  ufp/ml).



**Figura 5.4. Títulos virales obtenidos después de 10 pases seriados en presencia de 80  $\mu\text{g/ml}$  de AZC.** El primer pase se realizó infectando  $10^8$  bacterias con  $10^6$  ufp en un volumen de 1 ml y cada nuevo pase se inició con 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de fagos obtenida en el pase anterior (ver apartado 4.4.2 de Materiales y Métodos), manteniendo siempre la concentración de AZC indicada. Todos los pases se llevaron a cabo por duplicado. A pase número 10 se determinó el título viral de todas las poblaciones y en aquellas en las que no se observaron placas de lisis se titularon los pases anteriores hasta determinar el número de pase al cual se producía la extinción. Los títulos se determinaron por duplicado y el error estándar fue siempre menor del 10 %.

### 5.2.3 Determinación de la frecuencia de mutación

Para comprobar si la menor sensibilidad al AZC está acompañada de una menor sensibilidad a su acción mutagénica, se determinó la frecuencia de mutación mínima y máxima en un conjunto de clones biológicos aislados de varias de las poblaciones obtenidas en distintos puntos de las series de pases (**Tabla 5.1**). Los resultados mostraron que las poblaciones tratadas con AZC presentaban frecuencias de mutación más altas que las poblaciones no tratadas. Además se observó que la frecuencia de mutación aumentaba rápidamente durante los primeros pases realizados en presencia de bajas concentraciones de AZC, estabilizándose a pases posteriores en los que la concentración de AZC era mayor. Este hecho es compatible con la selección de un mecanismo de resistencia a la acción mutagénica del AZC.

**Tabla 5.1. Frecuencias de mutación mínima y máxima calculadas para las diferentes poblaciones evolucionadas en presencia y ausencia de AZC.**

Población	Nº clones (nº nucleótidos) <sup>1</sup>	Nº mutaciones	Frecuencia de mutación	
			Mínima <sup>2</sup>	Máxima <sup>3</sup>
Qβ0	7 (17.780)	4	$2,5 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$
Qβ <sub>control</sub> (0p60)	7 (17.780)	7	$3,0 \times 10^{-4}$	$4,2 \times 10^{-4}$
Qβ <sub>AZC</sub> (10p20)	5 (12.700)	25	$1,8 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$
Qβ <sub>AZC</sub> (20p30)	8 (20.320)	57	$2,6 \times 10^{-3}$	$2,8 \times 10^{-3}$
Qβ <sub>AZC</sub> (60p60)	11 (27.940)	92	$2,4 \times 10^{-3}$	$3,3 \times 10^{-3}$
Qβ <sub>AZC</sub> (80p70)	10 (25.400)	104	$3,0 \times 10^{-3}$	$4,1 \times 10^{-3}$

<sup>1</sup> Número total de nucleótidos secuenciados. La región secuenciada para cada clon está comprendida entre el nucleótido 1460 y el nucleótido 4000.

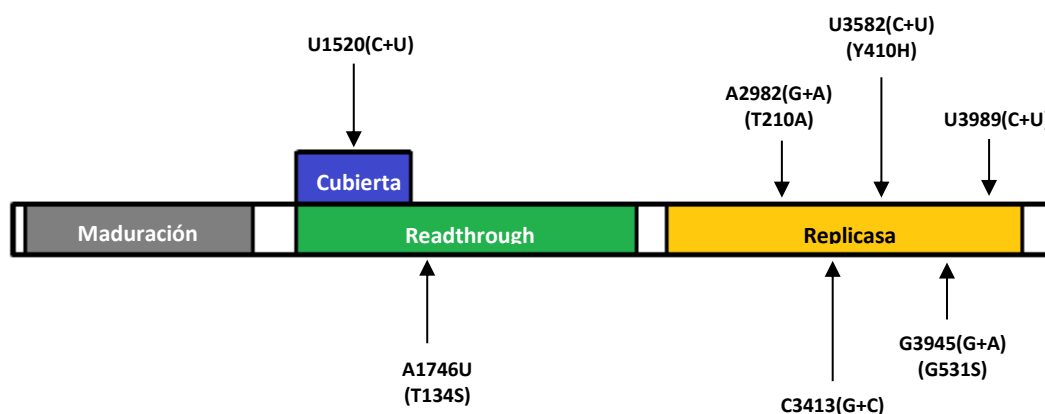
<sup>2</sup> Frecuencia de mutación mínima, calculada como el número de mutaciones diferentes presentes en los clones analizados dividido por el número total de nucleótidos secuenciados.

<sup>3</sup> Frecuencia de mutación máxima calculada como el número de mutaciones totales presentes en los clones analizados, dividido por el número total de nucleótidos secuenciados.

El análisis de la secuencia genética de los clones biológicos aislados de las poblaciones Qβ<sub>AZC</sub>(60p60) y Qβ<sub>AZC</sub>(80p70) mostró la presencia de algunas de las mutaciones polimórficas que ya habían sido identificadas en la secuencia consenso (**U1520C**, **A2982G**, **G3945A** y **U3989C**) y dos nuevas mutaciones en el gen de la replicasa, **C3413(G+C)** (sinónima) y **U3582(C+U)** (Y410H), que también estaban representadas a alta frecuencia en el espectro de mutantes de la población Qβ<sub>AZC</sub>(80p70). Todas ellas (**Figura 5.5**) son candidatas a presentar efectos beneficiosos en presencia de AZC, destacando las mutaciones A2982G y U3582C por su



localización en zonas altamente conservadas de la replicasa viral (Arribas y col. 2011, Kidmose y col. 2010, Takeshita y Tomita 2010).



**Figura 5.5. Mutaciones fijadas o representadas a alta frecuencia en las poblaciones del bacteriófago Qβ.** Se indican las mutaciones identificadas exclusivamente en las secuencias consenso y espectro de mutantes de las poblaciones pertenecientes a la línea evolutiva QβAZC.

### 5.3 VALOR SELECTIVO DE LAS MUTACIONES FIJADAS O REPRESENTADAS A ALTA FRECUENCIA EN LAS POBLACIONES EVOLUCIONADAS EN PRESENCIA DE AZC

#### 5.3.1 Evolución de clones biológicos aislados de las poblaciones propagadas en presencia de AZC

En una primera aproximación para determinar el valor selectivo de las mutaciones seleccionadas en presencia de AZC, se analizó el comportamiento evolutivo de varios clones biológicos aislados de las poblaciones QβAZC(30p40), QβAZC(60p60) y QβAZC(80p70), expuestas al AZC, y de la población Qβcontrol(0p60) no expuesta al AZC (**Tabla 5.2**). De este modo es posible valorar el comportamiento de las mutaciones fijadas o representadas a alta frecuencia en presencia de AZC cuando están presentes en un contexto genómico hipermutado. Todos los clones se sometieron a 10 pases seriados en ausencia y presencia de AZC (60 µg/ml) y se determinó la secuencia consenso de las nuevas poblaciones obtenidas. Este análisis mostró que las mutaciones A2982G y U3582C que se mantenían en presencia de AZC revertían en su ausencia, siendo este el único cambio que se observó en la secuencia consenso de las poblaciones obtenidas a pase número 10, respecto a las secuencias de los clones iniciales. Este

hecho es un claro indicio de que estas mutaciones presentan valor selectivo en presencia de AZC, mientras que poseen un coste en *fitness* en su ausencia.

**Tabla 5.2. Mutaciones presentes en la secuencia genómica de los clones biológicos que fueron sometidos a pases seriados en presencia y ausencia de AZC.**

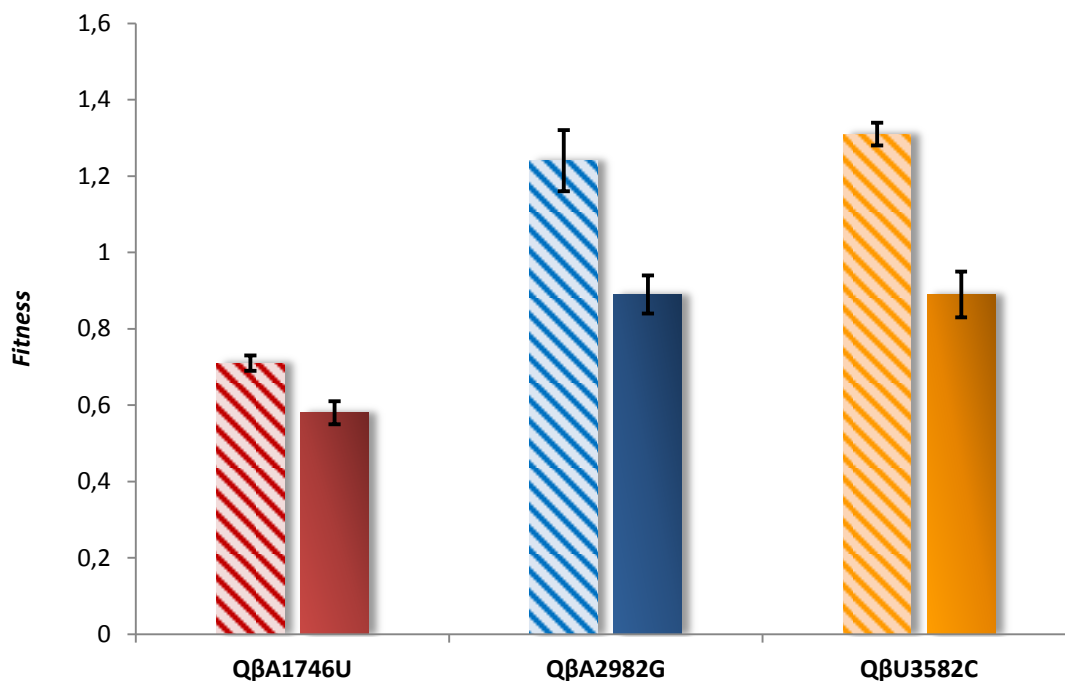
Clon viral <sup>1</sup>	Mutaciones <sup>2</sup>
CQ $\beta$ control(0p60)	G1773A, <b>A2187C</b> , G3002A, C3517U
CQ $\beta$ AZC(30p40)	<b>A1746U</b> , A1972G, U2153C, <b>A2187C</b> , C2378G, U2509C, A2598G, U3371C, C3517U
CQ $\beta$ AZC(60p60)	<b>U1520C</b> , <b>A1746U</b> , U1793C, U1934C, C2059G, C2184G, <b>A2187C</b> , A2948G, <b>A2982G</b> , U3590C, <b>G3945A</b> , <b>U3989C</b>
CQ $\beta$ AZC(80p70)	A1574G, <b>A1746U</b> , A1898G, U2060C, <b>A2187C</b> , U2425C, C2471G, U2558C, U2776C, A2949G, C3158G, A3268G, U3314C, <b>U3582C</b> , T3737C

<sup>1</sup> La población de la cual fue aislado cada clon aparece como subíndice.

<sup>2</sup> La región secuenciada está comprendida entre los nucleótidos 1460 y 4000. Las mutaciones fijadas o representadas a alta frecuencia en la población de origen de cada clon se indican en negrita.

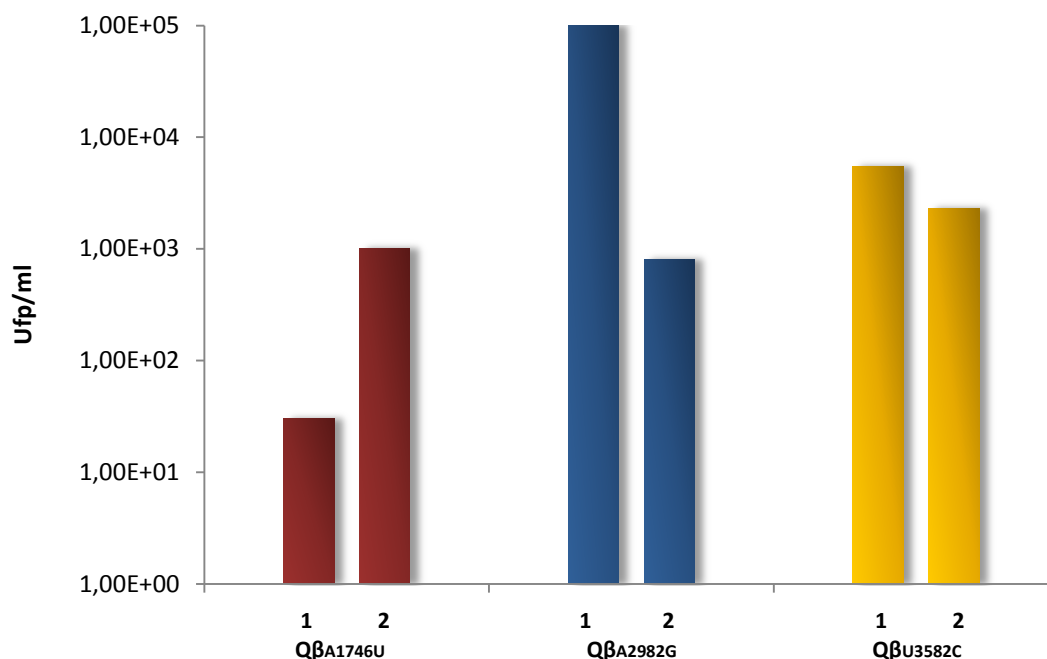
### 5.3.2 Valor selectivo de las mutaciones **A1746U**, **A2982G** y **U3582C**

Las mutaciones A1746U, A2982G y U3582C se introdujeron mediante mutagénesis dirigida en el vector de expresión del bacteriófago Q $\beta$ , pBRT7Q $\beta$  (ver apartado 4.3 de Materiales y Métodos) con el objetivo de determinar su valor selectivo. De este modo obtuvimos mutantes infecciosos que producían virus conteniendo únicamente la mutación indicada (Tabla 4.1). Se eligieron estas tres mutaciones debido a que la sustitución A1746U es la única que se fija en el genoma de las poblaciones evolucionadas en presencia de AZC, y las sustituciones A2982G y U3582C se encuentran localizadas en zonas altamente conservadas de la replicasa viral. La determinación de la tasa de crecimiento de cada uno de los mutantes nos permitió estimar su *fitness*, tal y como se indica en el apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos. El virus salvaje (Q $\beta$ wt) obtenido mediante la expresión del plásmido pBRT7Q $\beta$  se utilizó como virus de referencia en estos ensayos. Los resultados mostraron que los mutantes Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C presentaban valores de *fitness* más bajos que el virus Q $\beta$ wt en ausencia de AZC y más altos que el virus salvaje en presencia de mutágeno (**Figura 5.6**). Este resultado es acorde con la selección de ambas mutaciones en presencia de AZC y con el hecho de que reviertan en su ausencia. En el caso del mutante Q $\beta$ A1746U, observamos que presenta valores de *fitness* más bajos que el virus Q $\beta$ wt tanto en presencia como en ausencia de AZC, sorprendiendo este resultado, dado que esta mutación se fija en presencia de AZC y no revierte en su ausencia.



**Figura 5.6. *Fitness* relativo de los mutantes infecciosos indicados.** Las determinaciones se realizaron según se describe en el apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos. El *fitness* relativo se calculó dividiendo el valor obtenido para cada mutante por el valor del virus Qβwt ( $15.42 \pm 0.50$  en ausencia de AZC y  $9.68 \pm 0.22$  en presencia de  $60 \mu\text{g/ml}$  AZC). Las columnas lisas corresponden a los valores obtenidos en ausencia de AZC, mientras que las columnas con rayas corresponden a los obtenidos en presencia de AZC. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de las medias de los valores obtenidos en un ensayo llevado a cabo por triplicado.

Para ver si alguna de estas tres mutaciones confería resistencia a la extinción en presencia de AZC, los virus mutantes se propagaron durante 10 pases seriados en las condiciones descritas previamente que producen la extinción del virus (Cases-González y col. 2008; ver apartado 4.4.2 de Materiales y Métodos). Los resultados mostraron que mientras que el virus Qβwt se extinguía a pases 9 y 10, los mutantes mantuvieron su infectividad al menos hasta el pase número 10 (**Figura 5.7**). Este hecho indica que estas mutaciones otorgan al virus un mecanismo de resistencia a la extinción cuando replica en presencia de AZC.

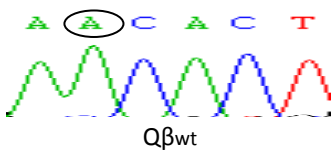
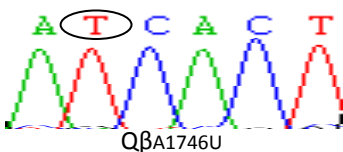
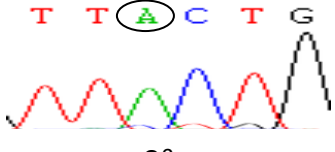
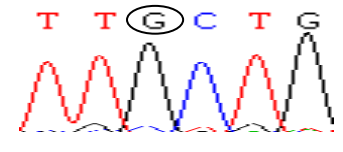
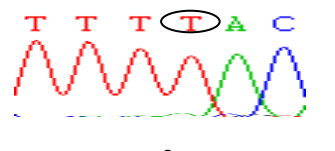
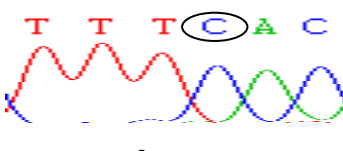


**Figura 5.7. Títulos virales obtenidos después de 10 pases seriados en presencia de 80 µg/ml de AZC.** El primer pase se realizó infectando  $10^8$  bacterias con  $10^6$  ufp en un volumen de 1 ml y cada nuevo pase se inició con 100 µl de la suspensión de fagos obtenida en el pase anterior (ver apartado 4.4.2 de Materiales y Métodos), manteniendo siempre la concentración de AZC indicada. Todos los pases se llevaron a cabo por duplicado. A pase número 10 se determinó el título viral de todas las poblaciones y en aquellas en las que no se observaron placas de lisis se titularon los pases anteriores hasta determinar el número de pase al cual se producía la extinción.

Las determinaciones del *fitness* de los distintos mutantes infecciosos indican que las mutaciones A2982G y U3582C son beneficiosas en presencia de AZC, mientras que la mutación A1746U no parece aportar ninguna ventaja ni en presencia ni en ausencia de AZC. Otra forma de comprobar la posible ventaja selectiva que presentan estas mutaciones en presencia de AZC consiste en hacer experimentos de competición entre los distintos virus mutantes y el virus salvaje y determinar si alguno de los virus llega a ser dominante en la población (ver apartado 4.6.3 de Materiales y Métodos). El análisis de la secuencia consenso (**Tabla 5.3**) de las poblaciones obtenidas tras la competición durante 5 pases seriados entre el virus Qβwt y cada uno de los mutantes infecciosos mostró en todos los casos que en presencia de AZC el virus mutante desplazaba al virus de genotipo salvaje, mientras que en ausencia de AZC era este último el que se imponía en la población. Este resultado indica que las tres mutaciones analizadas poseen ventaja selectiva en presencia de AZC, lo cual está de acuerdo con las determinaciones de *fitness* obtenidas para los mutantes QβA2982G y QβU3582C. El resultado, sin

embargo, contrasta con el hecho de que el mutante Q $\beta$ A1746U presente valores de *fitness* menores que el virus Q $\beta$ wt en las dos condiciones estudiadas. El resultado también muestra que las mutaciones A2982G y U3582C que permanecían como polimórficas en poblaciones heterogéneas, pueden llegar a fijarse cuando la complejidad del espectro de mutantes se reduce a dos virus competidores, siendo uno de ellos el virus salvaje.

**Tabla 5.3. Competición entre el virus salvaje y los mutantes infecciosos Q $\beta$ A1746U, Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C.**

Competición <sup>1</sup>	Secuencia consenso p5 <sup>2</sup> -AZC	Secuencia consenso p5 <sup>2</sup> +AZC (60 $\mu$ g/ml)
Q $\beta$ wt + Q $\beta$ A1746U	 Q $\beta$ wt	 Q $\beta$ A1746U
Q $\beta$ wt + Q $\beta$ A2982G	 Q $\beta$ wt	 Q $\beta$ A2982G
Q $\beta$ wt + Q $\beta$ U3582C	 Q $\beta$ wt	 Q $\beta$ U3582C

<sup>1</sup> Las competiciones se realizaron infectando inicialmente  $10^9$  bacterias con  $10^6$  ufp de cada virus competidor en un volumen de 10 ml, en ausencia o presencia de AZC (60  $\mu$ g/ml) y manteniendo una *moi* de 0,01 a lo largo de los pases.

<sup>2</sup> Se analizó la secuencia consenso de la población obtenida después de 5 pases. En cada caso se analizó únicamente la región específica en la que se encontraba la mutación de estudio (que se muestra enmarcada por un círculo encima de los cromatogramas).

A continuación se realizaron experimentos de competición entre los distintos virus mutantes para comprobar cuál de ellos ofrecía mayores ventajas selectivas. Los resultados obtenidos después de 5 pases en presencia de AZC (**Tabla 5.4**) mostraron que en estas condiciones el mutante Q $\beta$ A1746U era capaz de desplazar a los mutantes Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C, indicando que la mutación A1746U es la que posee mayor valor selectivo. Este resultado concuerda con el hecho de que esta mutación es la primera que aparece a lo largo de la serie de pases llevada a cabo en presencia de mutágeno y la única que llega a fijarse en el genoma de la población viral. El análisis de la secuencia consenso obtenida a pase número 5 en la

competición entre los mutantes Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C mostró la coexistencia de ambas mutaciones en la población resultante.

Los resultados de las competencias entre los distintos virus mutantes en ausencia de AZC mostraron que la única mutación presente, y además en forma polimórfica, era la mutación A1746U. Esto probablemente es debido a la reversión de las mutaciones A2982G y U3582C. Es de esperar que la mutación A1746U sea desplazada por el virus no mutado en esta posición en pases posteriores.

**Tabla 5.4. Mutaciones presentes en la secuencia consenso de las poblaciones obtenidas durante la competición entre diferentes mutantes infecciosos del bacteriófago Q $\beta$ .**

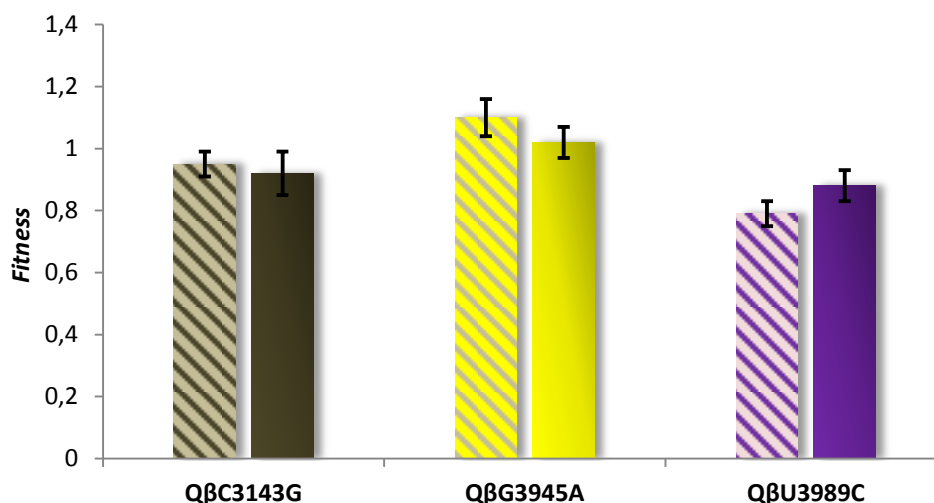
Competición <sup>1</sup>	Mutaciones presentes p5 <sup>2</sup> -AZC	Mutaciones presentes p5 <sup>2</sup> +AZC (60 $\mu$ g/ml)
Q $\beta$ A1746U + Q $\beta$ A2982G	A1746(U+A)	A1746U
Q $\beta$ A1746U + Q $\beta$ U3582C	A1746(U+A)	A1746U
Q $\beta$ A2982G + Q $\beta$ U3582C	No determinado	A2982(G+A) + U3582(C+U)
Q $\beta$ A1746U + Q $\beta$ A2982G + Q $\beta$ U3582C	A1746(U+A)	A1746U

<sup>1</sup> Las competencias se realizaron infectando inicialmente 10<sup>9</sup> bacterias con 10<sup>6</sup> o 10<sup>7</sup> ufp de cada virus competidor en un volumen de 10 ml, en ausencia o presencia de AZC (60  $\mu$ g/ml) y manteniendo una moi de 0,01 a lo largo de los pases.

<sup>2</sup> Se analizó la secuencia consenso de la población obtenida después de 5 pases. En cada caso se analizó únicamente la región específica en la que se encontraba la mutación de estudio.

### 5.3.3 Valor selectivo de las mutaciones C3413G, G3945A y U3989C

Las poblaciones evolucionadas en presencia de AZC presentan, además de las mutaciones A2982G y U3582C, otras mutaciones polimórficas que también están representadas a alta frecuencia. De entre ellas escogimos las mutaciones sinónimas C3413G y U3989C y la mutación G3945A localizada en una región no conservada de la replicasa viral para determinar si su elevada frecuencia se debe a que proporcionan alguna ventaja selectiva en presencia de AZC. Para realizar estos estudios se generaron mutantes infecciosos conteniendo cada una de las mutaciones en el contexto genómico del virus salvaje. La determinación del *fitness* de estos mutantes mostró que tanto en presencia como en ausencia de AZC, los virus Q $\beta$ C3413G y Q $\beta$ U3989C presentaban valores más bajos que el virus Q $\beta$ wt, mientras que el virus Q $\beta$ G3945A presentaba valores de *fitness* más altos en ambas condiciones (**Figura 5.8**).



**Figura 5.8. Fitness relativo de los mutantes infecciosos indicados.** Las determinaciones se realizaron según se describe en el apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos. El *fitness* relativo se calculó dividiendo el valor obtenido para cada mutante por el valor del virus Qβwt ( $15.42 \pm 0.50$  en ausencia de AZC y  $9.68 \pm 0.22$  en presencia de 60 µg/ml AZC). Las columnas lisas corresponden a los valores obtenidos en ausencia de AZC, mientras que las columnas con rayas corresponden a los obtenidos en presencia de AZC. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de las medias de los valores obtenidos en un ensayo llevado a cabo por triplicado.

Los ensayos de competición llevados a cabo entre cada uno de los mutantes infecciosos con el virus Qβwt mostraron que la mutación C3413G se mantiene como polimórfica después de 15 pases tanto en presencia como ausencia de AZC, la mutación G3945A se fija en el genoma de la población en ambas condiciones, mientras que la mutación U3989C no se ve favorecida en ninguno de los casos, siendo el nucleótido salvaje el que se impone en la población en tan solo 5 pases (Tabla 5.5).

**Tabla 5.5. Mutaciones presentes en la secuencia consenso de las poblaciones obtenidas durante la competición entre diferentes mutantes infecciosos del bacteriófago Qβ.**

Competición <sup>1</sup>	Mutaciones presentes -AZC	Mutaciones presentes +AZC (60 µg/ml)
Qβwt + QβC3413G (p15) <sup>2</sup>	C3413(G+C)	C3413(G+C)
Qβwt + QβG3945A (p15) <sup>2</sup>	G3945A	G3945A
Qβwt + QβU3989C (p5) <sup>2</sup>	Nucleótido salvaje (U)	Nucleótido salvaje (U)

<sup>1</sup> Las competiciones se realizaron infectando inicialmente  $10^9$  bacterias con  $10^6$  o  $10^7$  ufp de cada virus competidor en un volumen de 10 ml, en ausencia o presencia de AZC (60 µg/ml) y manteniendo una moi de 0,01 a lo largo de los pases.

<sup>2</sup> El número de pase al que se determinó la secuencia se indica entre paréntesis. En cada caso se analizó únicamente la región específica en la que se encontraba la mutación de estudio.

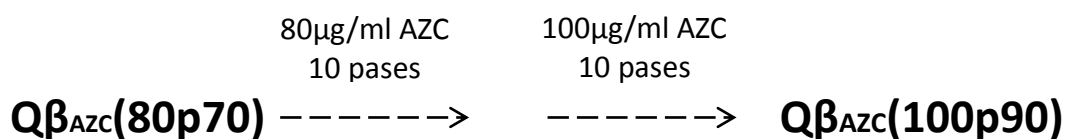
Estos resultados concuerdan con los valores de *fitness* mostrados en la Figura 5.8. La mutación C3413G tiene valores de *fitness* cercanos a la neutralidad tanto en presencia como en ausencia de AZC y por eso puede mantenerse como polimórfica en ambos casos. La mutación G3945A debe ser beneficiosa en ambas condiciones y por eso consigue desplazar al virus Q $\beta$ wt en 15 pases. Por el contrario, la mutación U3989C es eliminada en ambas competiciones, lo cual está de acuerdo con sus valores de *fitness* inferiores a los del virus Q $\beta$ wt. En conjunto, los valores de *fitness* observados y los ensayos de competición realizados con el virus salvaje muestran que estas mutaciones no aportan ventajas dependientes de la presencia de AZC cuando están presentes en el contexto mutacional del virus salvaje.

#### **5.4 ESTUDIO DE LAS CAUSAS DE LA PROLONGADA PRESENCIA COMO POLIMORFISMOS DE LAS MUTACIONES SELECCIONADAS EN PRESENCIA DE AZC**

##### **5.4.1 Distribución de mutaciones en el espectro de mutantes de las poblaciones del bacteriófago Q $\beta$ evolucionadas en presencia de AZC**

Como ya se ha indicado (ver apartado 5.2), el análisis de las secuencias consenso y los espectros de mutantes de las poblaciones obtenidas a lo largo de la serie de pases experimentados por el bacteriófago Q $\beta$  en presencia de AZC (Figura 5.1) reveló la presencia de varios polimorfismos que permanecieron como tales hasta el último pase realizado: G3945(A+G) y U3989(U+C), detectados a pase 40, A2982(G+A) y U1520(C+U), detectados a pase 50, y C3413(G+C) y U3582(C+U), detectados a pase 60. Con el objetivo de ver si estas mutaciones podían llegar a fijarse en la secuencia consenso, se dieron 20 pases adicionales a la población Q $\beta$ Azc(80p70) en presencia de concentraciones crecientes de AZC. Los primeros 10 pases se dieron en presencia de 80  $\mu$ g/ml de AZC y los otros 10 en presencia de 100  $\mu$ g/ml de AZC (**Figura 5.9**). Como resultado se obtuvo la población Q $\beta$ Azc(100p90) de la que se determinó la secuencia consenso (desde el nucleótido 180 al nucleótido 4180), comprobándose que ninguna de las mutaciones que se encontraban como polimórficas en la población Q $\beta$ Azc(80p70) había llegado a fijarse (Cabanillas y col. 2013). El análisis de la secuencia de 15 clones biológicos aislados de la población Q $\beta$ Azc(100p90) reveló la presencia de 9 mutaciones adicionales (C1604G, C2059G, A2277G, C2378G, C2384G, C2471G, C3545A, C3879G y A4006G) que también estaban representadas a alta frecuencia en el espectro de mutantes y que, por tanto, podrían representar nuevos polimorfismos.





**Figura 5.9. Evolución de la población Qβ<sub>AZC</sub>(80p70) durante 20 pases adicionales en presencia de concentraciones crecientes de AZC.** Los pases se realizaron del mismo modo que para las poblaciones anteriores (Figura 5.1). Cada nuevo pase fue iniciado con 1 ml de la suspensión de fagos obtenida en el pase anterior (ver apartado 4.4.1 de Materiales y Métodos). Las poblaciones obtenidas en puntos concretos de la serie se nombraron indicando la máxima concentración de AZC a la que habían sido expuestas, seguido del número de pases totales dados a la población (entre paréntesis).

Un análisis detallado de los cromatogramas de la secuencia consenso de las poblaciones previas a la población Qβ<sub>AZC</sub>(100p90) mostró que las nuevas mutaciones que aparecen como polimorfismos en esta población, ya eran detectables en pases anteriores como una doble banda en los cromatogramas (**Tabla 5.6**). Del mismo modo, se observó que algunas de las mutaciones polimórficas que habían sido identificadas previamente (Figura 5.5) también eran visibles a pases más tempranos (**Tabla 5.6**).

**Tabla 5.6. Mutaciones polimórficas en la población Qβ<sub>AZC</sub>(100p90).**

Mutación	Localización <sup>1</sup>	Cambio aminoácido <sup>2</sup>	Nº de pase <sup>3</sup>
<b>U1520C</b>	Cubierta/A1	-	p50
<b>C1604G</b>	Cubierta/A1	-	p60
<b>C2059G</b>	A1	T/S	p60
<b>A2277G</b>	A1	K/E	p90
<b>C2378G</b>	Replicasa	N/K	p90
<b>C2384(G+U)</b>	Replicasa	-	p60
<b>C2471G</b>	Replicasa	-	p30
<b>A2982G</b>	Replicasa	T/A	p50
<b>C3413(U+G)</b>	Replicasa	-	p50
<b>C3545A</b>	Replicasa	-	p70

*Continúa en la página siguiente*

<b>U3582C</b>	Replicasa	Y/H	p50
<b>C3879G</b>	Replicasa	L/V	p70
<b>G3945A</b>	Replicasa	G/S	p40
<b>U3989C</b>	Replicasa	-	p30
<b>A4006G</b>	Replicasa	K/R	p60

<sup>1</sup> Gen en el que se encuentra localizada la mutación.

<sup>2</sup> Tipo de cambio producido en la secuencia de aminoácidos de la proteína.

<sup>3</sup> Numero de pase al cual la mutación pudo ser detectada por primera vez como una doble banda en los cromatogramas.

Con objeto de caracterizar la evolución de la distribución de mutaciones en el espectro de mutantes de las poblaciones del bacteriófago Q $\beta$  propagadas en presencia de AZC, se comparó la secuencia de los clones biológicos que habían sido aislados previamente de las poblaciones Q $\beta$ <sub>AZC</sub>(60p60) y Q $\beta$ <sub>AZC</sub>(80p70) (Tabla 5.1) con la de los aislados de la población Q $\beta$ <sub>AZC</sub>(100p90) (**Tabla 5.7**). Todos los genomas mostrados en la tabla 5.7 contienen también las mutaciones A2187C y A1746U, fijadas a pases 30 y 40 respectivamente, además de un número adicional de mutaciones que son exclusivas de cada uno de ellos (**ver anexo 1**). Este análisis mostró que la mayoría de las mutaciones polimórficas se encuentran en múltiples contextos mutacionales, lo cual puede ser indicativo de una alta frecuencia de mutaciones recurrentes (que han surgido varias veces de forma independiente). En contraste a este resultado, se observó que las mutaciones A2982G y U3582C no se observaban nunca juntas en el mismo genoma, sugiriendo que debe de haber al menos dos líneas evolutivas que han evolucionado de manera independiente la una de la otra. Este hecho resulta sorprendente si tenemos en cuenta que ambas mutaciones presentan ventajas selectivas en presencia de AZC y, por tanto, su combinación en el mismo genoma podría llevar a la generación de un virus mejor adaptado.

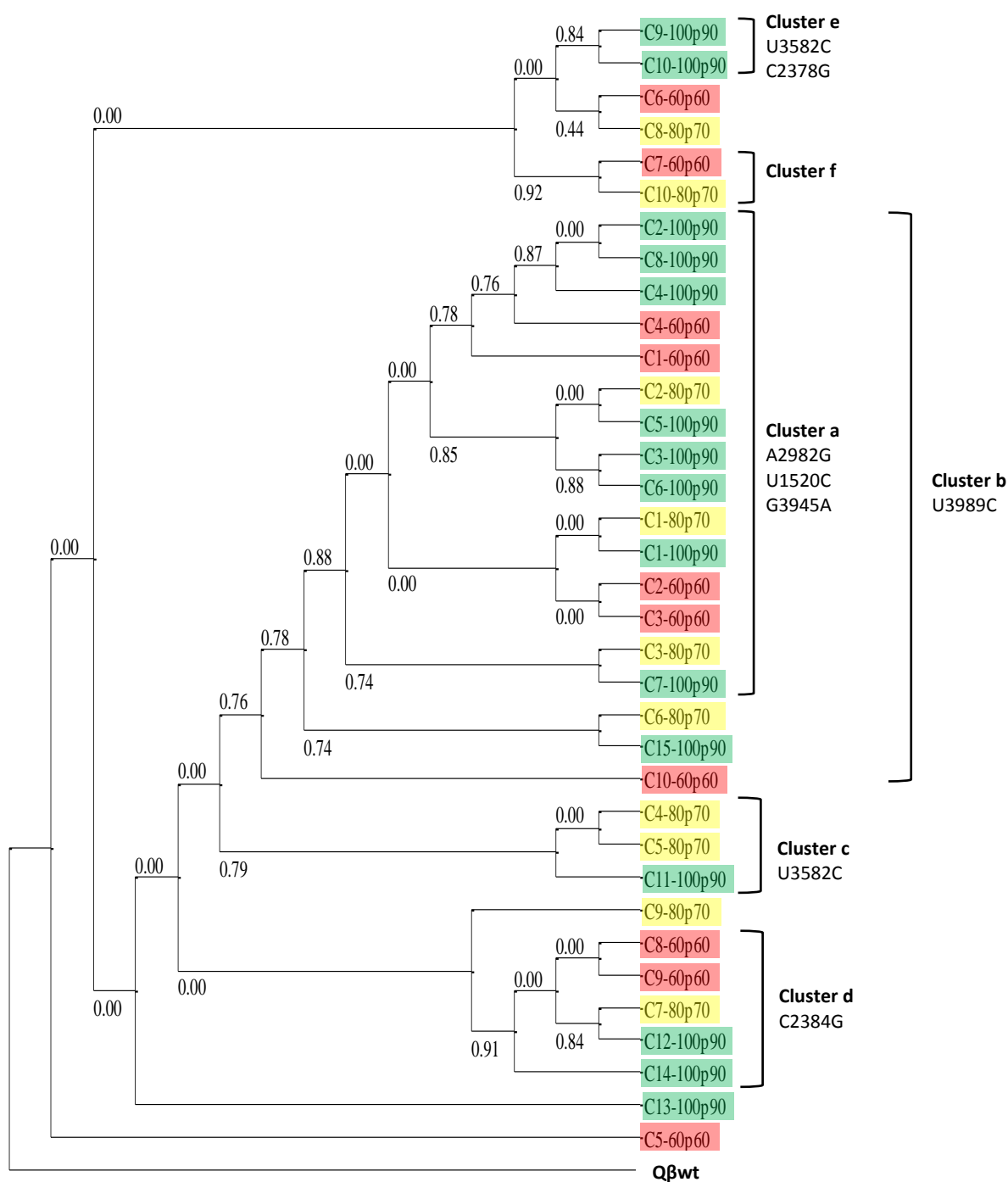
Tabla 5.7. Distribución de mutaciones polimórficas en los clones biológicos aislados de las poblaciones Q $\beta$ <sub>AZC</sub>(60p60), Q $\beta$ <sub>AZC</sub>(80p70) y Q $\beta$ <sub>AZC</sub>(100p90).

Población Q $\beta$ <sub>AZC</sub>	Clon	Mutaciones <sup>2</sup>
Q $\beta$ (60p60) <sup>1</sup>	C1	U1520C C1604G <b>A2982G</b> C3413U G3945A U3989C
	C2	U1520C <b>A2982C</b> G3945A U3989C
	C3	U1520C <b>A2982G</b> G3945A U3989C
	C4	U1520C C1604G C2471G <b>A2982G</b> G3945A U3989C
	C5	-
	C6	C3413G A4006G
	C7	A2277G C2378G
	C8	C2384G
	C9	C2384G C2471G
	C10	U3989C
Q $\beta$ (80p70) <sup>1</sup>	C1	U1520C <b>A2982G</b> G3945A U3989C
	C2	U1520C C2059G <b>A2982G</b> G3945A U3989C
	C3	U1520C C2384G <b>A2982G</b> C3413G G3945A U3989C
	C4	<b>U3582C</b>
	C5	C2471G <b>U3582C</b>
	C6	C2384G C3413G <b>U3582C</b> G3945A U3989C
	C7	C2059G C3413G
	C8	C3413G
	C9	-
	C10	C2471G C3879G
Q $\beta$ (100p90)	C1	U1520C <b>A2982G</b> G3945A U3989C
	C2	U1520C C1604G C2471G <b>A2982G</b> C3545A G3945A U3989C A4006G
	C3	U1520C C2059G A2277G C2378G <b>A2982G</b> G3945A U3989C
	C4	U1520C C1604G <b>A2982G</b> C3545A G3945A U3989C A4006G
	C5	U1520C C2059G C2384G <b>A2982G</b> G3945A U3989C
	C6	U1520C C2059G A2277G C2471G <b>A2982G</b> G3945A U3989C
	C7	U1520C A2277G <b>A2982G</b> C3545A C3879G G3945A U3989C
	C8	U1520C C1604G C2059G C2471G <b>A2982G</b> C3413G C3545A G3945A U3989C A4006G
	C9	C2378G <b>U3582C</b> C3879G
	C10	C2378G <b>U3582C</b> A4006G
	C11	C2059G A2277G C2384G C3413G <b>U3582C</b> G3945A U3989C
	C12	A2277G C2384G
	C13	C1604G C2378G C2384G
	C14	U1520C A2277G C2384G G3945A
	C15	C3413G C3879G G3945A U3989C

<sup>1</sup> Los clones biológicos de estas poblaciones son los mismos que se usaron para determinar la frecuencia de mutación de las poblaciones en el apartado 5.2 de resultados (Tabla 5.1).

<sup>2</sup> Se consideran mutaciones representadas a alta frecuencia aquellas que aparecen más de 0,2 veces por genoma. Las mutaciones A2982G y U3582C aparecen marcadas en negrita para resaltar que no aparecen nunca juntas en el mismo genoma. Todos los clones se secuenciaron desde el nucleótido 1485 al nucleótido 4028.

Un análisis filogenético llevado a cabo con el conjunto de los 35 genomas analizados en las tres poblaciones de estudio ( $Q\beta_{AZC}(60p60)$ ,  $Q\beta_{AZC}(80p70)$  y  $Q\beta_{AZC}(100p90)$ ) (**Figura 5.10**), mostró que aquellos que tienen en común las mutaciones U1520C, A2982G y G3945A, pueden pertenecer a la misma línea evolutiva, dado que forman un único grupo con un alto valor de *bootstrap* (*cluster a*). Este grupo está incluido en otro mayor que contiene algunos genomas adicionales que presentan además la mutación U3989C (*cluster b*). El resto de los genomas forman 4 grupos independientes (*cluster c*, *cluster d*, *cluster e* y *cluster f*). El hecho de que todos los genomas que contienen la mutación A2982G estén agrupados en el mismo *cluster*, mientras que los genomas que contienen la mutación U3582C estén distribuidos en varios, sugiere que la mutación U3582C ha aparecido repetidamente en diferentes líneas evolutivas.



**Figura 5.10. Análisis filogenético de los genomas virales aislados de las poblaciones del bacteriófago  $Q\beta$  evolucionadas en presencia de AZC.** Los genomas utilizados corresponden a los indicados en la tabla 5.7. Los de la población  $Q\beta_{AZC}(60p60)$  están marcados en rojo, los de la población  $Q\beta_{AZC}(80p70)$  en amarillo y los de la población  $Q\beta_{AZC}(100p90)$  están marcados en verde. El árbol fue construido mediante un método de máxima verosimilitud (programa Seaview 4, PhyML) (Gouy y col. 2010, Guindon y col. 2010) usando la secuencia del virus salvaje ( $Q\beta_{wt}$ ) como raíz del árbol. Los números de cada nodo representan el valor de *bootstrap* (llevado a cabo con 100 réplicas). Los *clusters* descritos en el texto aparecen en la figura con las mutaciones en común que presentan cada uno de ellos.

### 5.4.2 Estudio de la interferencia entre las mutaciones A2982G y U3582C

El hecho de que las mutaciones A2982G y U3582C no lleguen a fijarse a pesar de las ventajas que aportan al virus en presencia de AZC podría indicar que ambas mutaciones poseen valor selectivo similar y, por tanto, ninguna de ellas sería capaz de desplazar a la otra, estableciéndose un fenómeno de competición entre ambas que retrasaría su fijación. Los resultados obtenidos en los experimentos de competición realizados previamente (Tabla 5.4) estarían de acuerdo con esta idea. Para confirmarlo, prolongamos la competición entre los mutantes infecciosos Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C durante 15 pases adicionales en presencia de 60  $\mu$ g/ml de AZC, llegando así hasta el pase número 20, del cual se determinó la secuencia consenso (Tabla 5.8). Los resultados mostraron que ninguna de las mutaciones había llegado a fijarse a pase número 20, reforzando la idea de que la propagación de los genomas que contienen la mutación A2982G interfiere con la propagación de los genomas que contienen la mutación U3582C. Por otro lado, dado que estas dos mutaciones siempre aparecen en genomas que ya contienen la mutación A1746U, analizamos el comportamiento de los dobles mutantes Q $\beta$ A1746U+A2982G (DM1) y Q $\beta$ A1746U+U3582C (DM2) en ensayos de competición entre ellos (Tabla 5.8). Los resultados obtenidos refuerzan la idea de que ambas mutaciones deben tener valores selectivos similares, lo que impide que cualquiera de ellas llegue a desplazar a la otra. Además se realizaron ensayos de competición entre cada uno de los dobles mutantes con el mutante sencillo Q $\beta$ A1746U. En este caso, los resultados mostraron que el doble mutante presenta mayor ventaja que el mutante sencillo Q $\beta$ A1746U (Tabla 5.8).

**Tabla 5.8. Mutaciones presentes en la secuencia consenso de las poblaciones obtenidas durante la competición entre distintos mutantes infecciosos del bacteriófago Q $\beta$ .**

Competición <sup>1</sup>	Mutaciones presentes p5 <sup>2</sup> +AZC (60 $\mu$ g/ml)	Mutaciones presentes p20 <sup>2</sup> +AZC (60 $\mu$ g/ml)
Q $\beta$ A2982G + Q $\beta$ U3582C	A2982(G+A) + U3582(C+U)	A2982(G+A) + U3582(C+U)
DM1 + DM2	A1746U + A2982(G+A) + U3582(C+U)	A1746U + A2982(G+A) + U3582(C+U)
Q $\beta$ A1746U + DM1	A1746U + A2982G	No determinado
Q $\beta$ A1746U + DM2	A1746U + U3582C	No determinado
Q $\beta$ A1746U + DM1 + DM2	A1746U + A2982(G+A) + U3582(C+U)	A1746U + A2982(G+A) + U3582(C+U)

<sup>1</sup> Las competiciones se realizaron infectando inicialmente 10<sup>9</sup> bacterias con 10<sup>6</sup> o 10<sup>7</sup> ufp de cada virus competidor en un volumen de 10 ml, en presencia de AZC (60  $\mu$ g/ml) y manteniendo una moi de 0,01 a lo largo de los pases.

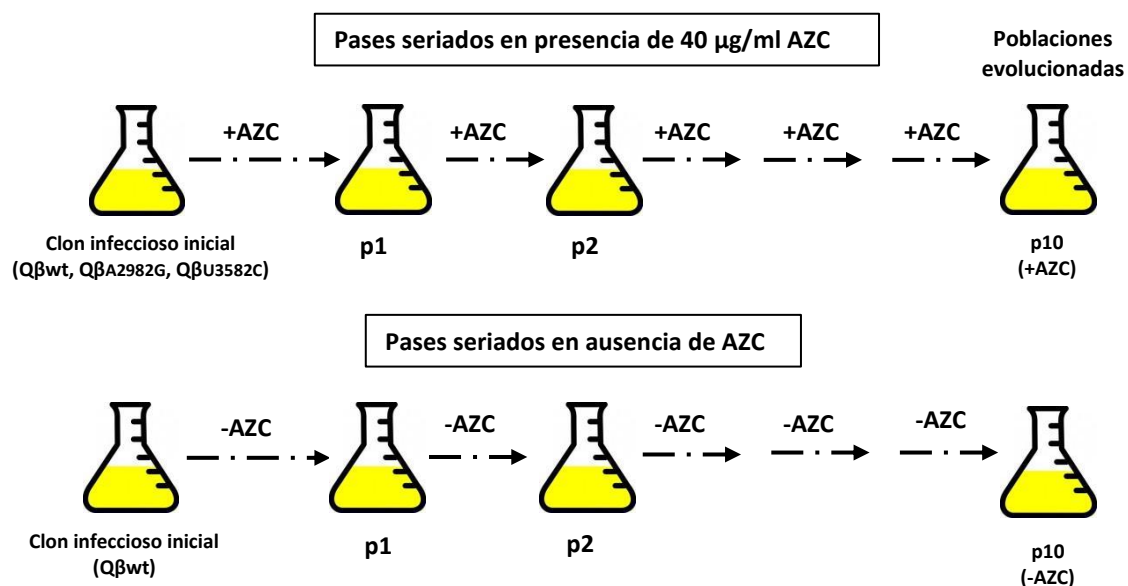
<sup>2</sup> Se analizó la secuencia consenso de la población obtenida después de 5 pases (p5) o 20 (p20). En cada caso se analizó únicamente la región específica en la que se encontraba la mutación de estudio.

Dada la elevada tasa de error del bacteriófago Q $\beta$  y el elevado número de mutaciones recurrentes encontrado en los espectros de mutantes de las poblaciones evolucionadas en presencia de AZC (Tabla 5.7), sorprende que no se haya seleccionado un genoma que contenga ambas mutaciones. Una posible explicación para este hecho es que el doble mutante tenga menor *fitness* que cualquiera de los mutantes sencillos, seleccionándose en contra a lo largo de la evolución. Para analizar esta idea intentamos generar el doble mutante Q $\beta$ A2982G+U3582C mediante mutagénesis dirigida. Los resultados obtenidos mostraron la introducción satisfactoria de ambas mutaciones en el vector de expresión del bacteriófago Q $\beta$ . Sin embargo, no fue posible recuperar virus de ninguna de las bacterias transformadas con el doble mutante, aunque sí se pudo recuperar virus a partir de cada uno de los mutantes individuales en ensayos llevados a cabo en paralelo. Estos resultados sugieren que la presencia de ambas mutaciones en el mismo genoma es letal o altamente deletérea para el virus.

## **5.5 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS MUTACIONES LOCALIZADAS EN EL GEN DE LA REPLICASA**

### **5.5.1 Determinación de la frecuencia de mutación de las poblaciones generadas a partir de los mutantes infecciosos Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C**

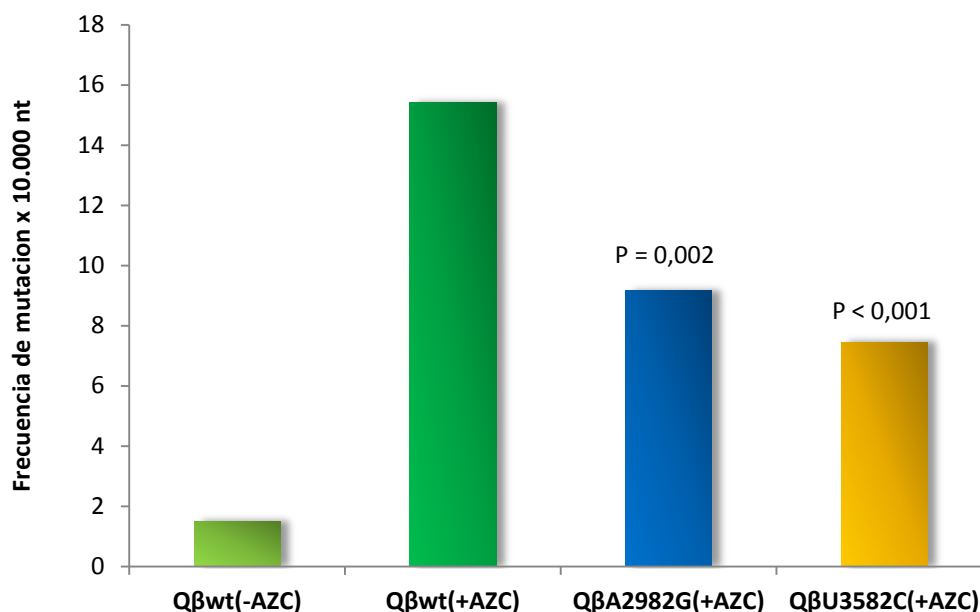
Para investigar el mecanismo por el cual las mutaciones A2982G y U3582C presentan ventajas selectivas en presencia de AZC, los mutantes infecciosos Q $\beta$ A2982G, Q $\beta$ U3582C y el virus Q $\beta$ wt, se sometieron a 10 pases seriados en presencia de 40  $\mu$ g/ml de AZC (**Figura 5.11**). Este último también fue propagado durante el mismo número de pases en ausencia de mutágeno. Dado que las mutaciones A2982G y U3582C son deletéreas en ausencia de AZC y reversiones a pases tempranos en estas condiciones, la evolución de estos mutantes solo se realizó en presencia de AZC.



**Figura 5.11. Evolución de los virus indicados en presencia y ausencia de AZC.** El virus Qβwt y los mutantes infecciosos QβA2982G y QβU3582C se propagaron durante 10 pases seriados en presencia de 40 µg/ml de AZC o en su ausencia (Qβwt). El proceso se inició infectando  $10^9$  bacterias *E.coli* Hfr con  $10^7$  ufp del virus correspondiente en un volumen de 10 ml. Cada nuevo pase se realizó con  $10^7$  ufp procedentes del sobrenadante obtenido en el pase anterior. Las poblaciones obtenidas tras 10 pases se nombraron del mismo modo que el virus inicial, indicando si los pases habían tenido lugar en presencia (+AZC) o en ausencia (-AZC) de AZC.

De cada una de las poblaciones obtenidas se aislaron 15 clones biológicos que fueron secuenciados para determinar la frecuencia de mutación máxima ( $F_m$ ) de cada población, calculada como el número total de mutaciones dividido por el número total de nucleótidos secuenciados. En este análisis se identificaron 7 mutaciones en la población Qβwt(-AZC) ( $F_m = 1,7 \times 10^{-4}$ ), 91 en la población Qβwt(+AZC) ( $F_m = 1,54 \times 10^{-3}$ ), 54 en la población QβA2982G(+AZC) ( $F_m = 9,15 \times 10^{-4}$ ) y 44 en la población QβU3582C(+AZC) ( $F_m = 7,45 \times 10^{-4}$ ). Los resultados obtenidos mostraron una reducción significativa de las frecuencias de mutación de las poblaciones QβA2982(+AZC) y QβU3582C(+AZC), con respecto a la población Qβwt(+AZC). La reducción fue más acentuada en la población QβU3582C(+AZC) (Test Chi-cuadrado  $P < 0.001$ ) que en la población QβA2982(+AZC) (Test Chi-cuadrado  $P = 0.002$ ) (Figura 5.12). Todas las frecuencias de mutación fueron significativamente más altas que la de la población evolucionada en ausencia de AZC (Test Chi-cuadrado  $P < 0.005$ ).





**Figura 5.12. Frecuencia de mutación de las poblaciones evolucionadas en presencia y ausencia de AZC.** La frecuencia de mutación se expresa como el número de mutaciones totales dividido por el número total de nucleótidos analizados multiplicado por 10.000. Los genomas de los clones obtenidos de las poblaciones evolucionadas en presencia de AZC se secuenciaron desde el nucleótido 250 al 4180, mientras que los de los virus aislados de la población Qβwt(-AZC) se secuenciaron desde el nucleótido 1500 al 4180. La estimación del valor *P* mediante el test Chi-cuadrado muestra una reducción significativa de las frecuencias de mutación de las diferentes poblaciones mutantes respecto a la población Qβwt(+AZC), tal como se indica encima de cada columna.

### 5.5.2 Caracterización de los espectros de mutantes de las poblaciones generadas a partir de los mutantes infecciosos QβA2982G y QβU3582C

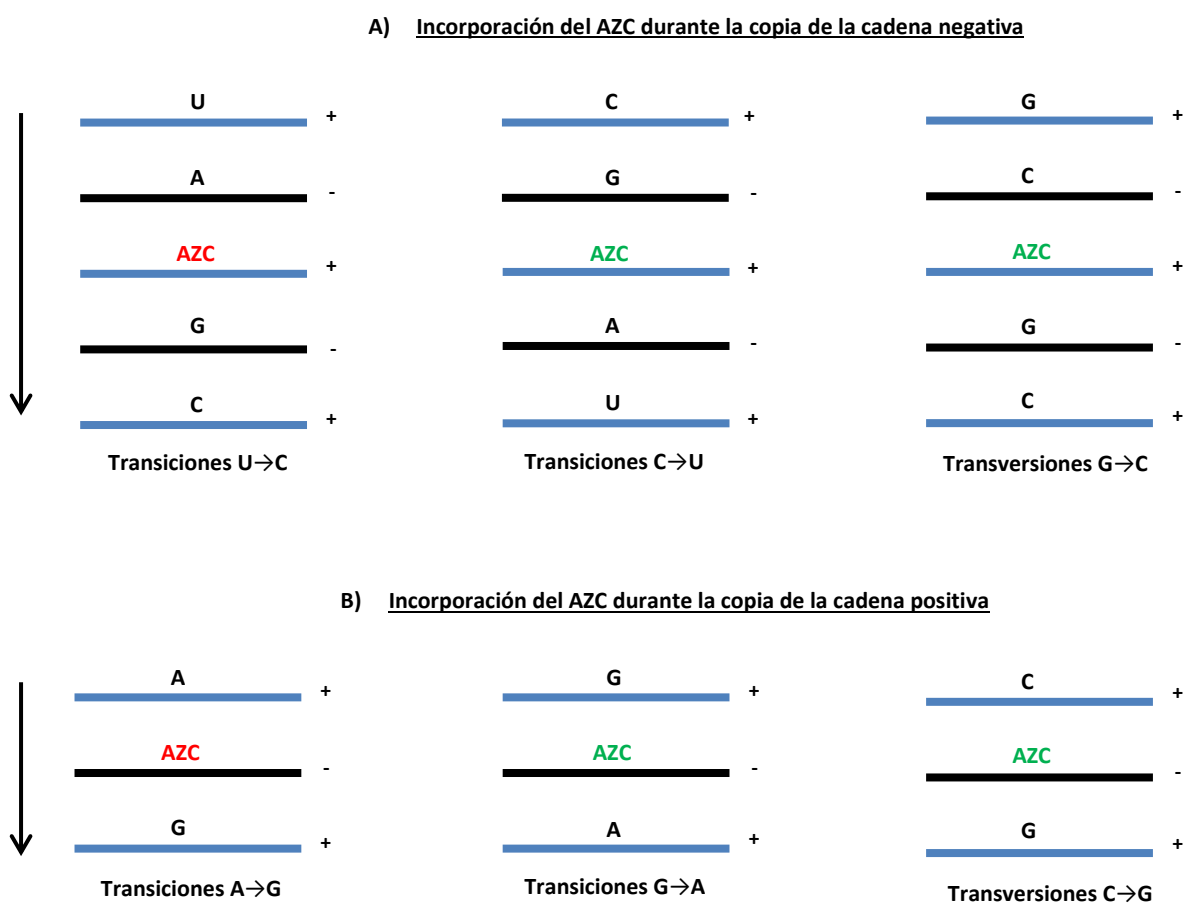
El análisis de los espectros de mutantes de las poblaciones descritas en el apartado anterior, mostró que el AZC incrementa la frecuencia de la mayoría de los tipos de sustituciones (**Tabla 5.9**). Este efecto es más marcado para las transiciones **U→C** y **A→G**, que representan el 77% del total de las mutaciones analizadas en las poblaciones Qβwt(+AZC) y QβU3582C(+AZC) y el 68,5% en la población QβA2982G(+AZC), frente al 57% de la población Qβwt(-AZC). Además, aunque en menor proporción, se observó también un incremento de las substituciones **C→G**. En todas las poblaciones el porcentaje total de transiciones fue mayor (más del 80% en todos los casos), que el de transversiones. La similitud en la distribución de mutaciones inducidas por el AZC en las poblaciones Qβwt(+AZC), QβA2982G(+AZC) y QβU3582C(+AZC) indica que el mecanismo de acción de este compuesto es similar en el virus Qβwt y en los mutantes que contienen las mutaciones en la replicasa. En la **Figura 5.13** se

muestran posibles rutas para la incorporación del AZC durante la replicación del genoma del virus que podrían explicar su efecto mutagénico.

**Tabla 5.9. Número y tipo de mutaciones detectadas en las poblaciones virales evolucionadas en presencia y ausencia de AZC.**

Tipo de mutación	Cambio nucleótido	Nº de mutaciones <sup>1</sup>			
		Qβwt(-AZC)	Qβwt(+AZC)	QβA2982G(+AZC)	QβU3582C(+AZC)
Transiciones	U → C	2	55	27	27
	A → G	2	15	10	7
	C → U	0	4	4	2
	G → A	2	3	3	0
Transversiones	C → G	0	9	9	8
	C → A	0	3	0	0
	A → C	1	0	0	0
	G → U	0	1	0	0
	U → G	0	1	0	0
Nº total de mutaciones		<b>7</b>	<b>91</b>	<b>54</b>	<b>44</b>

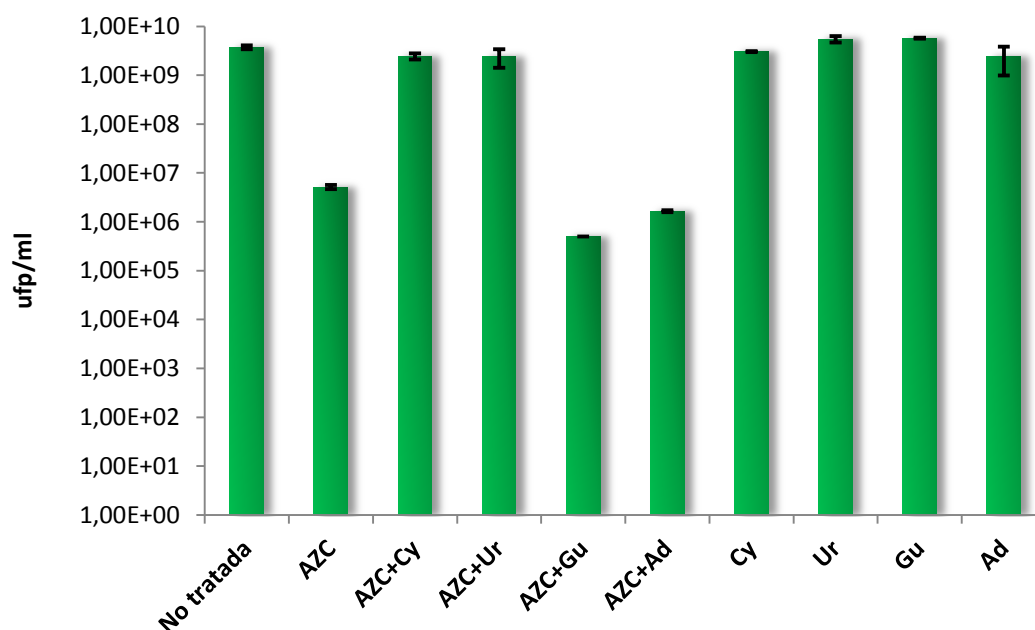
<sup>1</sup> Número de mutaciones del tipo indicado en el conjunto de clones secuenciados de cada población. Los clones y poblaciones analizados son los mismos indicados en la Figura 5.12.



**Figura 5.13. Consecuencias mutagénicas de la incorporación del AZC durante la replicación del genoma viral.** **A)** Incorporación durante la copia de la hebra negativa: i) *Transiciones U→C*, ocurren si el AZC se introduce en lugar del uracilo, y posteriormente se aparea con guanina, ii) *Transiciones C→U*, tienen lugar cuando el AZC se introduce en lugar de la citosina y en la hebra complementaria se introduce una adenina y iii) *Transversiones G→C*, ocurren cuando el AZC aparea erróneamente con una citosina dando lugar a la incorporación de una guanina en la hebra complementaria. **B)** Incorporación del AZC durante la copia de la hebra positiva: i) *Transiciones A→G*, ocurren cuando el AZC se introduce en lugar de uracilo y da lugar a la incorporación de una guanina en la hebra positiva. ii) *Transiciones G→A*, ocurren cuando el AZC se introduce en lugar de citosina y en la hebra complementaria se introduce una adenina y iii) *Transversiones C→G*, tienen lugar cuando el AZC se introduce en lugar de guanina dando lugar a la introducción de otra guanina en la nueva hebra positiva. El AZC marcado en rojo indica su incorporación en lugar de uracilo, mientras que marcado en verde indica su incorporación en lugar de citosina. La flecha indica el flujo de la información genética desde el genoma parental al mutado.

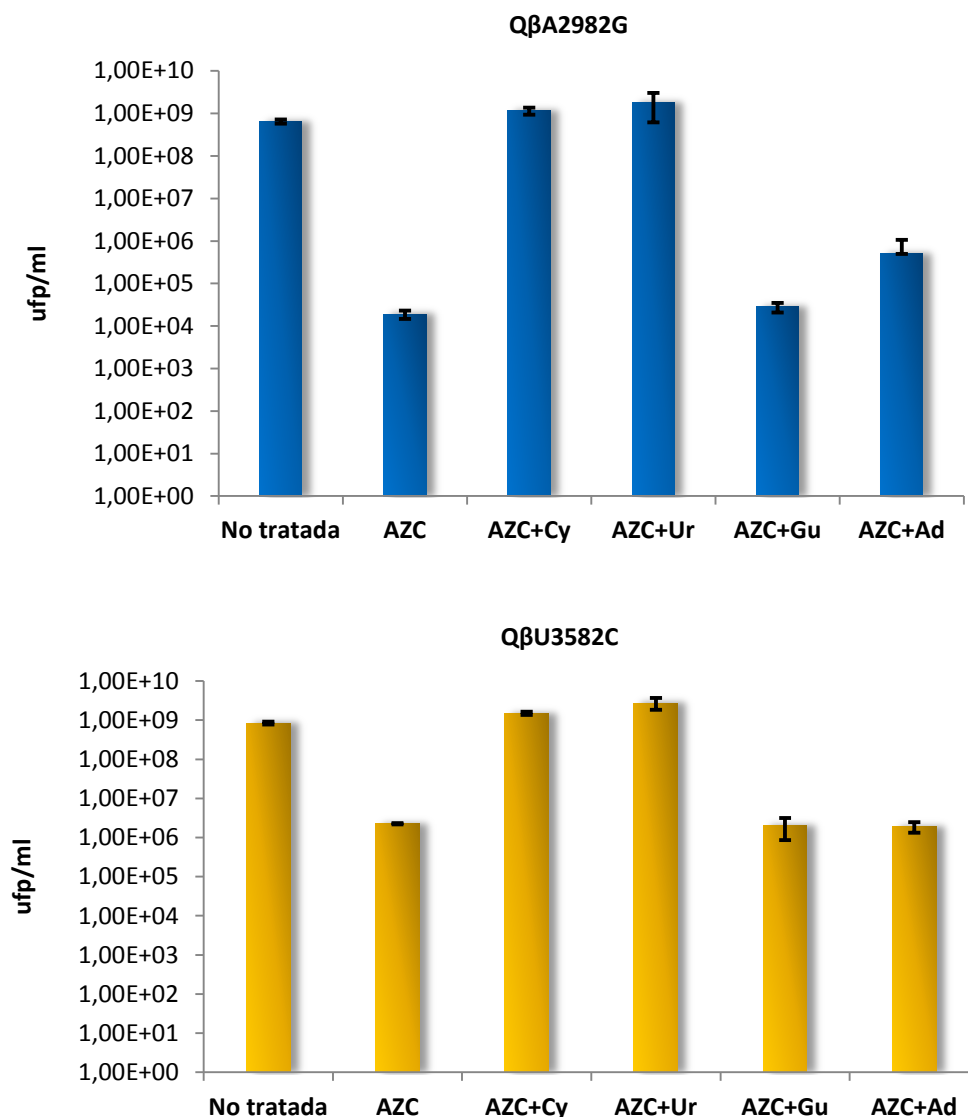
### 5.5.3 Efectos producidos por la adición de nucleósidos no mutagénicos durante la replicación en presencia de AZC

Los resultados del apartado anterior sugieren que el AZC actúa como un análogo de pirimidinas. Para confirmarlo se realizó un ensayo de replicación del virus Q $\beta$ wt en presencia de AZC y de cada uno de los nucleósidos no mutagénicos con el objetivo de comprobar si alguno de ellos revertía la acción del AZC (**Figura 5.14**).



**Figura 5.14. Replicación del bacteriófago Q $\beta$  en presencia de AZC y nucleósidos no mutagénicos.** El proceso de replicación viral se realizó para el virus Q $\beta$ wt infectando  $10^8$  bacterias con  $10^4$  ufp del virus en 1 ml y en ausencia o presencia de AZC (60  $\mu$ g/ml) y el doble de la concentración molar de nucleósidos no mutagénicos (491.4  $\mu$ M). Las diferentes condiciones experimentales se indican debajo de cada columna. Las barras de error representan la desviación estándar de los valores de los títulos obtenidos en un ensayo realizado por triplicado.

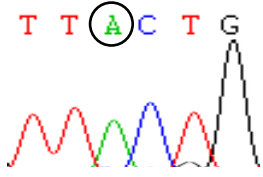
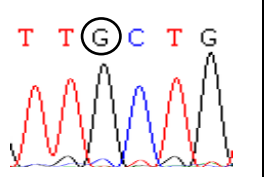
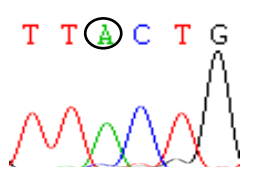
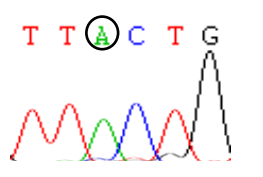
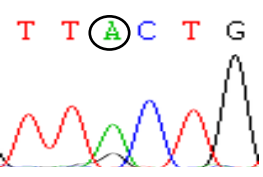
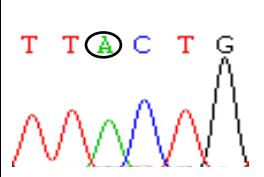
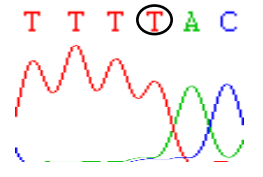
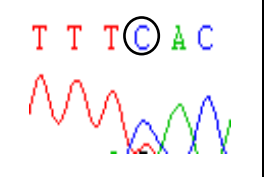
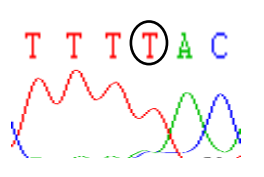
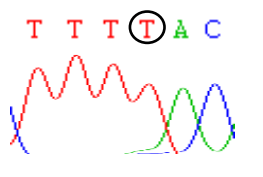
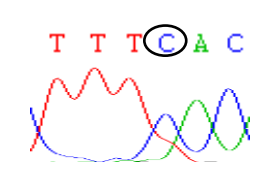
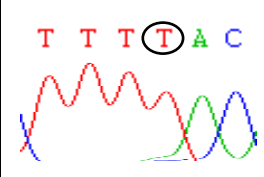
Los resultados mostraron que la inhibición causada por el AZC en el rendimiento viral es revertida en presencia de pirimidinas, mientras que la adición de purinas no tiene ningún efecto observable. Como control del experimento se muestra que la adición de cualquiera de los nucleósidos no mutagénicos en ausencia de AZC no altera los títulos virales. En el caso de los mutantes infecciosos Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C, se observó que, al igual que ocurre con el virus Q $\beta$ wt, el efecto del AZC fue revertido en presencia de un exceso de pirimidinas, alcanzándose valores en los títulos virales similares a los que se observan en las muestras no tratadas. Nuevamente, en presencia de un exceso de purinas se obtuvieron títulos similares a los producidos cuando el virus replica sólo en presencia de AZC (**Figura 5.15**).



**Figura 5.15. Replicación de los mutantes QβA2982G y QβU3582C en presencia de AZC y nucleósidos no mutagénicos.** El proceso de replicación viral se realizó para los mutantes infecciosos indicados infectando  $10^8$  bacterias con  $10^4$  ufp del virus en 1 ml y en ausencia o presencia de AZC (60  $\mu\text{g/ml}$ ) y el doble de la concentración molar de nucleósidos no mutagénicos (491.4  $\mu\text{M}$ ). Las diferentes condiciones experimentales se indican debajo de cada columna. Las barras de error representan la desviación estándar de los valores de los títulos obtenidos en un ensayo realizado por duplicado.

Estos resultados hacen suponer que la ventaja selectiva que presentan las mutaciones QβA2982G y QβU3582C en presencia de AZC podría revertirse por la adición de un exceso de pirimidinas. Para comprobarlo se realizaron ensayos de competición entre el virus Qβwt y cada mutante infeccioso en presencia de AZC y nucleósidos no mutagénicos. A pase número 5 se determinó la secuencia consenso para ver si alguno de los virus llegaba a ser dominante. En el caso de que a pase 5 ninguno de los virus competidores hubiera conseguido desplazar al otro, se prolongó la competición durante varios pases adicionales (**Tabla 5.10**).

Tabla 5.10. Secuencia consenso de las poblaciones obtenidas en los ensayos de competición entre los mutantes infecciosos Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C y el virus Q $\beta$ wt en presencia de AZC y nucleósidos no mutagénicos.

Competición <sup>1</sup>	Q $\beta$ wt + Q $\beta$ A2982G					
Condición	No tratada	AZC (60 $\mu$ g/ml)	AZC+Cy (60 $\mu$ g/ml + 491.4 $\mu$ M)	AZC+Ur (60 $\mu$ g/ml + 491.4 $\mu$ M)	AZC+Gu (60 $\mu$ g/ml + 491.4 $\mu$ M)	AZC+Ad (60 $\mu$ g/ml + 491.4 $\mu$ M)
Nº pase	p5	p5	p5	p5	p15	p10
Cromatograma						
Secuencia consenso <sup>2</sup>	A	G	A	A	A+G	A
Competición <sup>1</sup>	Q $\beta$ wt + Q $\beta$ U3582C					
Condición	No tratada	AZC (60 $\mu$ g/ml)	AZC+Cy (60 $\mu$ g/ml + 491.4 $\mu$ M)	AZC+Ur (60 $\mu$ g/ml + 491.4 $\mu$ M)	AZC+Gu (60 $\mu$ g/ml + 491.4 $\mu$ M)	AZC+Ad (60 $\mu$ g/ml + 491.4 $\mu$ M)
Nº pase	p5	p5	p5	p5	p15	p15
Cromatograma						
Secuencia consenso <sup>2</sup>	U (T)	C	U (T)	U (T)	C	U (T)

<sup>1</sup> Las competiciones se realizaron infectando inicialmente 10<sup>9</sup> bacterias con 10<sup>5</sup> ufp de cada virus competidor en ausencia o presencia de AZC (60  $\mu$ g/ml) y nucleósidos mutagénicos (491,4  $\mu$ M), manteniendo una moi < 0,01 a lo largo de los pases.

<sup>2</sup> Se determinó la secuencia consenso de las poblaciones obtenidas tras varios pases. En cada caso se analizó únicamente la región específica en la que se encontraba la mutación de estudio (que se muestra enmarcada por un círculo encima de los cromatogramas).

Los resultados de la tabla 5.10 muestran que, según ya había sido determinado en las competiciones realizadas (ver apartado 5.3.3), en ausencia de AZC el virus salvaje se impone en 5 pases, mientras que en presencia de AZC es el virus mutante el que lo hace. Cuando la competición tuvo lugar en presencia de AZC más nucleósidos pirimidínicos, el efecto del AZC fue revertido y el virus salvaje dominó en la población tras 5 pases, confirmando que la ventaja selectiva de los mutantes desaparece en estas condiciones. Los nucleósidos púricos mostraron el mismo efecto aunque en un grado más bajo. En presencia de AZC+Ad, el nucleótido salvaje pudo desplazar al mutante, aunque necesitó 10 pases en la competición con el mutante Q $\beta$ A2982G y 15 pases en el caso del mutante Q $\beta$ U3582C. En el caso de la competición en presencia de AZC+Gu el nucleótido mutante llegó a fijarse después de 15 pases en la competición entre el virus Q $\beta$ wt y el mutante Q $\beta$ U3582C, mientras que continuó como polimorfismo en el caso del mutante Q $\beta$ A2982G.

Con el objetivo de determinar si la reducción del valor selectivo de las mutaciones que se observa en presencia de nucleósidos no mutagénicos está asociada a disminuciones en la frecuencia de mutación en presencia de AZC, el virus Q $\beta$ wt fue propagado en presencia de AZC más una purina (AZC+Gu) o en presencia de AZC más una pirimidina (AZC+Cy). De las poblaciones obtenidas a pase número 10 se aislaron 10 clones biológicos para determinar la frecuencia de mutación de cada población y compararla con las frecuencias de mutación de la población no tratada con mutágeno, Q $\beta$ wt(-AZC) y de la propagada únicamente en presencia de AZC, Q $\beta$ wt(+AZC) (Tabla 5.11).

**Tabla 5.11. Frecuencias de mutación de las poblaciones evolucionadas en presencia de AZC y nucleósidos no mutagénicos.**

Población <sup>1</sup>	Frecuencia de mutación máxima <sup>2</sup>
Q $\beta$ wt(-AZC)	1,7x10 <sup>-4</sup>
Q $\beta$ wt(+AZC)	1,5x10 <sup>-3</sup>
Q $\beta$ wt(+AZC+Cy)	2,6x10 <sup>-4</sup>
Q $\beta$ wt(+AZC+Gu)	1,0x10 <sup>-3</sup>

<sup>1</sup> Todas las poblaciones se obtuvieron tras someter al virus Q $\beta$ wt a 10 pases seriados en ausencia o presencia de AZC (40  $\mu$ g/ml) (Figura 5.11) y en presencia de AZC más el doble de la concentración molar de Cy o Gu (491.4  $\mu$ M). El proceso se inició infectando 10<sup>9</sup> bacterias con 10<sup>7</sup> ufp del virus en un volumen de 10 ml. Cada nuevo pase se realizó con 10<sup>7</sup> ufp procedentes del sobrenadante obtenido en el pase anterior. Las poblaciones obtenidas tras 10 pases en presencia de AZC y nucleósidos se nombraron del mismo modo que el virus inicial, indicando que la evolución había tenido lugar en presencia de AZC y Cy (+AZC+Cy) o en presencia de AZC y Gu (+AZC+Gu).

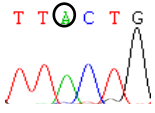
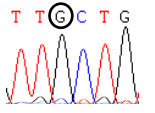
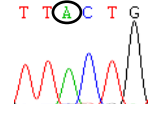
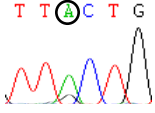
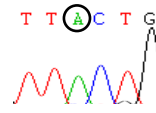
<sup>2</sup> La frecuencia de mutación máxima se calculó como el número de mutaciones totales dividido por el número total de nucleótidos secuenciados.

Como se observa en la tabla anterior, la población propagada en presencia de AZC+Cy presenta una frecuencia de mutación significativamente menor que la población pasada únicamente con AZC (Test Chi-cuadrado  $P < 0,001$ ) y similar a la observada en la población pasada en ausencia de nucleósidos (Test Chi-cuadrado  $P = 0,55$ ). Por otro lado, la población propagada en presencia de AZC+Gu, aunque presenta una frecuencia de mutación mayor que la de la población propagada en presencia de AZC+Cy, también es significativamente menor que la de la población propagada solo en presencia de AZC (Test Chi-cuadrado  $P = 0,036$ ). Estos resultados indican que el efecto mutagénico del AZC se ve ligeramente reducido en presencia de purinas y altamente reducido en presencia de pirimidinas.

#### 5.5.4 Valor selectivo de las mutaciones A2982G y U3582C en presencia de agentes mutagénicos diferentes al AZC

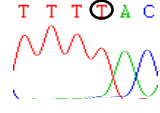
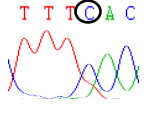
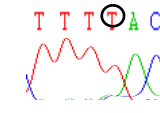
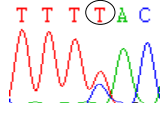
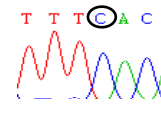
Con el objetivo de ver si las mutaciones de la replicasa A2982G y U3582C son capaces de contrarrestar los efectos de otros análogos de nucleósidos mutagénicos, determinamos su valor selectivo en presencia de Rib y 5-FU. Para ello se hicieron competencias entre el virus Q $\beta$ wt con cada uno de los mutantes infecciosos en presencia de 75  $\mu$ g/ml de 5-FU, o 500  $\mu$ M de Rib. Los resultados mostraron que en presencia de Rib ambos mutantes eran desplazados por el virus salvaje a pase número 5. Sin embargo, en presencia de 75  $\mu$ g/ml de 5-FU, el cromatograma de la secuencia consenso a pase 5 mostró una mezcla del nucleótido salvaje y el mutante para ambas competencias, de manera que se continuó dando pases a una concentración de 100  $\mu$ g/ml de 5-FU hasta ver si alguno de los dos nucleótidos se fijaba en la población (Tabla 5.12).

**Tabla 5.12.** Secuencia consenso de las poblaciones obtenidas durante la competición en presencia de AZC, Rib o 5-FU entre el virus Q $\beta$ wt y los mutantes infecciosos Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C.

Competición <sup>1</sup>	Q $\beta$ wt + Q $\beta$ A2982G				
Condición	No tratada	AZC (60 $\mu$ g/ml)	Rib (500 $\mu$ M)	5-FU (75 $\mu$ g/ml)	5-FU (100 $\mu$ g/ml) <sup>3</sup>
Nº pase	p5	p5	p5	p5	p20
Cromatograma					
Secuencia consenso <sup>2</sup>	A	G	A	A+G	A

*Continúa en la página siguiente*



Competición <sup>1</sup>	Qβwt + QβU3582C				
Condición	No tratada	AZC (60 µg/ml)	Rib (500 µM)	5-FU (75 µg/ml)	5-FU (100 µg/ml) <sup>3</sup>
Nº pase	p5	p5	p5	p5	p15
Cromatograma					
Secuencia consenso <sup>2</sup>	U (T)	C	U (T)	U(T)+C	C

<sup>1</sup> Las competencias se realizaron infectando inicialmente  $10^9$  bacterias con  $10^6$  o  $10^7$  ufp de cada virus competidor, manteniendo una moi de 0,01 a lo largo de los pases.

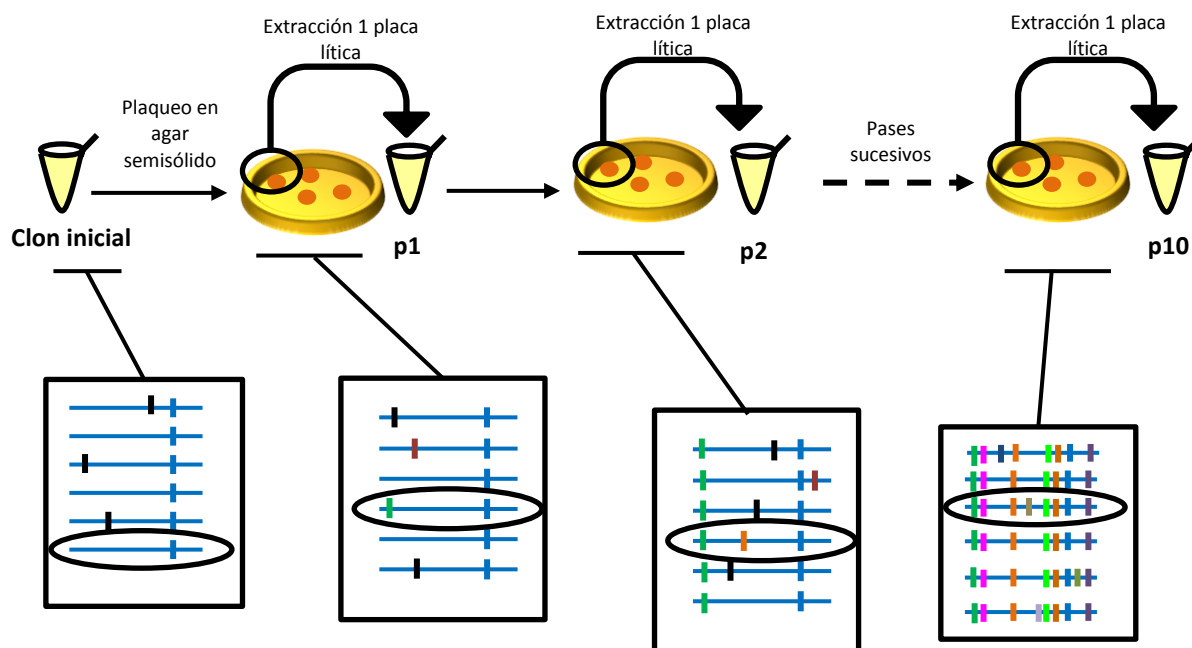
<sup>2</sup> Se analizó la secuencia consenso de la población obtenida después de varios pases. En cada caso se analizó únicamente la región específica en la que se encontraba la mutación de estudio (que se muestra enmarcada por un círculo encima de los cromatogramas).

<sup>3</sup> La sucesión de pases realizados a 100 µg/ml de 5-FU se llevó a cabo a partir del pase p5 procedente de las competencias en presencia de 75 µg/ml de 5-FU.

Las competencias en presencia de 5-FU mostraron que el virus salvaje era capaz de desplazar al mutante QβA2982G en 20 pases, mientras que el mutante QβU3582C necesito 15 pases para desplazar al virus salvaje. Estos resultados contrastan con la fuerte ventaja selectiva que ambos mutantes poseen en presencia de AZC. La adición de 5-FU mejoró el *fitness* de los mutantes, pero no fue capaz de reproducir los efectos en el *fitness* de ambas mutaciones en presencia de AZC.

### 5.5.5 Acumulación de mutaciones en ausencia de selección en los mutantes infecciosos QβA2982G y QβU3582C

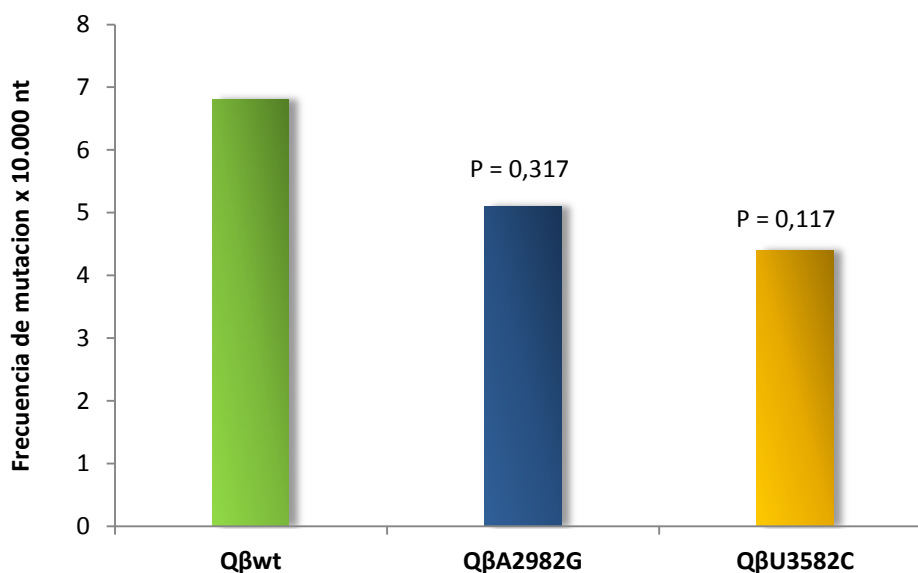
Los resultados mostrados hasta ahora indican que las mutaciones A2982G y U3582C son capaces de reducir la frecuencia de mutación del bacteriófago Qβ en presencia de AZC. Sin embargo no resuelven si estas mutaciones incrementan la fidelidad general de la replicasa viral. Para responder esta pregunta sería necesario comparar las frecuencias de mutación de los mutantes y del virus salvaje en ausencia de AZC, algo que es difícil de realizar dado que ambas mutaciones reversion en esas condiciones. Una posible solución consiste en propagar los distintos virus bajo condiciones de selección relajada a través de pases placa a placa (**Figura 5.16**). Para ello, se realizaron 10 pases placa a placa independientes a partir de 11 placas líticas del clon Qβwt, 11 placas líticas del mutante QβA2982G y 17 placas líticas del mutante QβU3582C. Dado que cada placa lítica resulta de la replicación de una única partícula infecciosa y que la selección está limitada al desarrollo de cada placa, la acumulación de mutaciones espontáneas puede ocurrir incluso si éstas presentan efectos deletéreos.



**Figura 5.16. Esquema mostrando el ensayo de acumulación de mutaciones a través de pases placa a placa.** En la parte inferior se representan los genomas (líneas horizontales) correspondientes a los virus contenidos en una única placa de lisis. Los genomas difieren en varias líneas verticales que corresponden a las mutaciones. Inicialmente todos los genomas llevan incorporada la mutación correspondiente al mutante infeccioso y, dado que este corresponde a un clon biológico, algunos genomas pueden además presentar otras mutaciones diferentes. A lo largo de los pases se van seleccionando distintas placas de lisis que contienen las mutaciones iniciales y otras nuevas que se han ido acumulando. La selección de las placas líticas en cada pase se realizó al azar.

El análisis de la secuencia de las placas de lisis obtenidas después de 10 pases placa a placa mostró que la mutación A2982G estaba presente en las 11 líneas evolutivas, mientras que la mutación U3582C se encontraba en 14 de las 17 líneas. Adicionalmente, las líneas obtenidas tras la evolución del virus Q $\beta$ wt habían acumulado un total de 28 mutaciones, mientras que las obtenidas tras la evolución de los mutantes Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C que conservaron sus mutaciones características, presentaron 21 y 23 mutaciones totales respectivamente. Los valores medios de las frecuencias de mutación máximas de todas las líneas procedentes del mismo virus (**Figura 5.17**) mostraron que las obtenidas a partir de los virus mutantes Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C ( $Fm = 5.1 \times 10^{-4}$  y  $Fm = 4.4 \times 10^{-4}$ , respectivamente) presentaban valores menores que las obtenidas a partir del virus salvaje ( $Fm = 6.8 \times 10^{-4}$ ). Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $P = 0.317$  y  $P = 0.117$  respectivamente, test Chi-cuadrado). El resultado sugiere que las dos mutaciones en la replicasa no confieren un incremento general en la fidelidad de la enzima o que éste es tan

pequeño que no puede tener significación estadística con el número de réplicas y pases analizados.



**Figura 5.17. Frecuencias de mutación de los clones biológicos obtenidos tras la evolución de los virus indicados a través de 10 pases placa a placa.** Las placas de lisis obtenidas al final de las series de pases placa a placa realizados tanto con el virus Qβwt como con los mutantes QβA2982G y QβU3582C que mantuvieron las mutaciones A2982G y U3582C respectivamente, se secuenciaron desde el nucleótido 250 al 4020. La frecuencia de mutación se estimó como el número de mutaciones totales dividido por el número total de nucleótidos secuenciados y multiplicado por 10.000, en el conjunto de líneas evolutivas realizadas a partir del mismo virus inicial. La estimación del valor  $P$  mediante el test Chi-cuadrado, mostró una reducción no significativa de las frecuencias de mutación en la secuencia de las placas de lisis obtenidas a partir de los virus mutantes respecto a las obtenidas a partir del virus salvaje, tal y como se indica encima de cada columna.

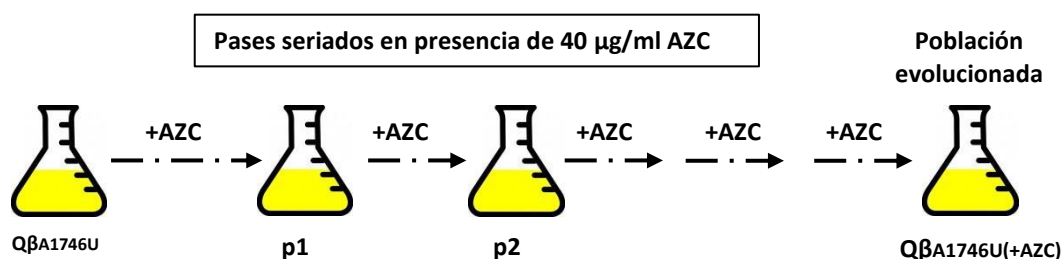
Los resultados también mostraron que la frecuencia de mutación de las placas de lisis obtenidas tras la evolución durante 10 pases placa a placa del virus Qβwt fue significativamente mayor que la frecuencia de mutación de la población Qβwt evolucionada durante 10 pases en medio líquido y ausencia de AZC (Test Chi-cuadrado  $P < 0.001$ ), confirmando que la selección es más débil durante la transmisión del virus a través de pases placa a placa que durante la transmisión en medio líquido utilizando altos tamaños poblacionales.

## 5.6 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA MUTACIÓN A1746U LOCALIZADA EN EL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA A1

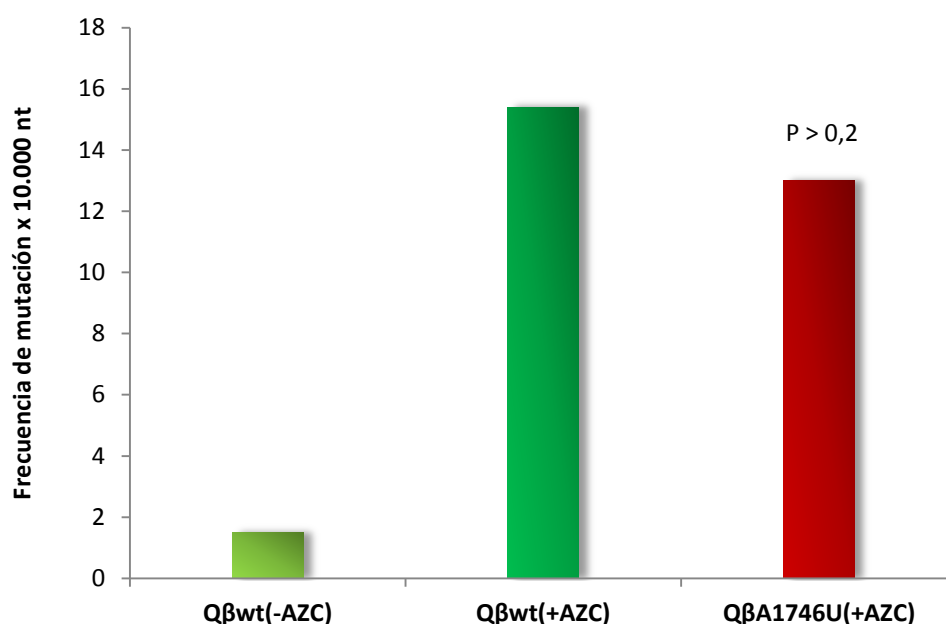
La proteína A1, codificada por la región comprendida entre los nucleótidos 1344 y 2330, se expresa únicamente cuando el codón de terminación UGA de la proteína de cubierta se lee de forma errónea introduciendo un triptófano y continuando la síntesis de la proteína en aproximadamente 200 nuevos aminoácidos (Weiner y Weber 1971). Cuando el virus replica en presencia de AZC se produce la fijación de la mutación A1746U en el nucleótido inmediatamente posterior al codón de terminación de la proteína de cubierta. Existen diversos estudios que demuestran que los nucleótidos situados en el entorno de los codones de terminación están implicados en la regulación de la síntesis de proteínas *readthrough* (Salser 1969, Fluck y col. 1977), lo cual nos hizo pensar que la mutación A1746U podría afectar a los niveles de expresión de la proteína A1. Esta mutación, que además es la única que se fija de forma exclusiva en la secuencia consenso de las poblaciones del bacteriófago Q $\beta$  evolucionadas en presencia de AZC (Figura 5.5), proporciona una clara ventaja selectiva al virus en estas condiciones (Tabla 5.3) y su efecto es mayor que el de las otras mutaciones que también se seleccionan en presencia de AZC (Tabla 5.4).

### 5.6.1 Frecuencia de mutación de la población generada a partir del mutante Q $\beta$ A1746U

Con el objetivo de ver si la mutación A1746U reducía el efecto mutagénico producido por el AZC, sometimos el mutante infeccioso Q $\beta$ A1746U a 10 pases seriados en presencia de 40  $\mu$ g/ml de AZC (Figura 5.18). De la población obtenida aislamos 15 clones biológicos que fueron secuenciados para estimar la frecuencia de mutación de la población. Los resultados permitieron identificar 77 mutaciones totales, lo cual supone una frecuencia de mutación máxima de  $1,3 \times 10^{-3}$  sustituciones por nucleótido. Este valor es significativamente superior al obtenido para la población Q $\beta$ wt evolucionada en ausencia de AZC ( $P < 0,01$  test Chi-cuadrado), pero no difiere significativamente del de la población Q $\beta$ wt evolucionada en presencia de AZC ( $P > 0,2$  test Chi-cuadrado) (Figura 5.19). Estos resultados concuerdan con el hecho de que la mutación A1746U está localizada en el gen de una proteína no implicada en replicación, lo cual tendría como consecuencia que la producción de errores no se vería afectada, a diferencia de lo que ocurre en el caso de las mutaciones A2982G y U3582C situadas en el gen de la replicasa que sí presentan diferencias significativas respecto a la población Q $\beta$ wt evolucionada en presencia de AZC (ver apartado 5.5).



**Figura 5.18. Evolución del mutante infeccioso QβA1746U en presencia de AZC.** El mutante infeccioso QβA1746U se propagó durante 10 pases seriados en presencia de 40 µg/ml de AZC. El proceso se inició infectando  $10^9$  bacterias *E.coli* *Hfr* con  $10^7$  ufp del virus en un volumen de 10 ml. Cada nuevo pase se realizó con  $10^7$  ufp procedentes del sobrenadante obtenido en el pase anterior. La población obtenida tras 10 pases se nombró del mismo modo que el virus inicial, indicando que los pases habían tenido lugar en presencia de AZC (+AZC). Esta serie de pases se realizó en paralelo a las series de pases realizadas con el virus Qβwt y los mutantes infecciosos QβA2982G y QβU3582C (Figura 5.11).



**Figura 5.19. Frecuencia de mutación de las poblaciones evolucionadas a partir de los virus indicados en presencia o ausencia de AZC.** La frecuencia de mutación se expresa como el número de mutaciones totales dividido por el número total de nucleótidos analizados multiplicado por 10.000. Los genomas de los clones obtenidos de las poblaciones evolucionadas en presencia de AZC se secuenciaron desde el nucleótido 250 al 4180, mientras que los genomas de los virus aislados de la población Qβwt(-AZC) se secuenciaron desde el nucleótido 1500 al 4180. La estimación del valor *P* mediante el test Chi-cuadrado, mostró una reducción no significativa de la frecuencia de mutación de la población obtenida a partir del virus mutante respecto a la obtenida a partir del virus salvaje, tal y como se indica encima de cada columna.

### 5.6.2 Caracterización del espectro de mutantes de la población generada a partir del mutante Q $\beta$ A1746U

El análisis de las mutaciones identificadas durante la secuenciación de los clones biológicos procedentes de la población obtenida a partir del mutante Q $\beta$ A1746U, mostró mayor número de transiciones (83,1%) que de transversiones (16,9%), siendo los cambios más comunes **U→C** y **A→G**, que representan el 55,8% y el 18,1%, respectivamente del total de mutaciones y un 67% y un 21,8% respectivamente del total de transiciones. Por otro lado, la transversión **C→G**, representa el 85% del total de transversiones encontradas (Tabla 5.13). Estos resultados, similares a los observados para las poblaciones obtenidas a partir del virus Q $\beta$ wt evolucionado en presencia de AZC y los mutantes Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C (Tabla 5.9), indican que la mutación A1746U no modifica el tipo de mutaciones inducido por la presencia del AZC, siendo el cambio **U→C** el más frecuente (Figura 5.13).

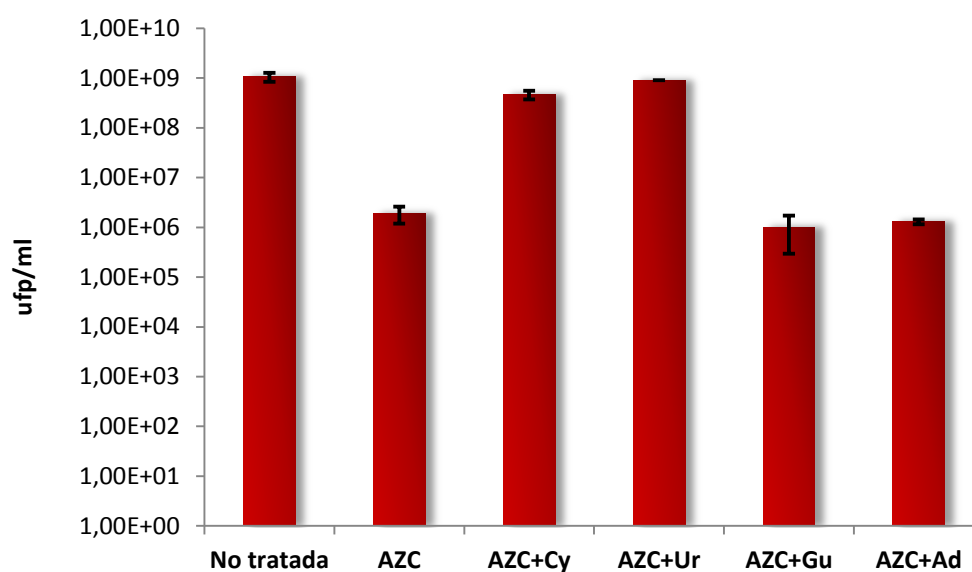
**Tabla 5.13. Número y tipos de mutaciones detectadas en los clones biológicos aislados de la población obtenida a partir de la evolución del mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de AZC.**

Tipo de mutación	Cambio nucleótido	Nº de mutaciones <sup>1</sup> Q $\beta$ A1746U
Transiciones (83,1%)	U → C	43
	A → G	14
	C → U	5
	G → A	2
Transversiones (16,9%)	C → G	11
	C → A	1
	U → A	1
	G → U	0
	U → G	0
	A → C	0
Nº total de mutaciones		77

<sup>1</sup> Número de mutaciones del tipo indicado en el conjunto de clones biológicos secuenciados de la población generada a partir del mutante Q $\beta$ A1746U (ver Figura 5.19).

### 5.6.3 Efecto de la adición de nucleósidos no mutagénicos durante la replicación del mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de AZC

Como hemos visto en el apartado 5.5 de resultados, el efecto inhibitorio del AZC en la replicación del virus salvaje Q $\beta$ wt y de los mutantes Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C revertía cuando se añadía al medio un exceso de pirimidinas, mientras que permanecía inalterado en presencia de un exceso equivalente de purinas (Figuras 5.14 y 5.15). Para comprobar si se obtenía un resultado similar durante la replicación del mutante Q $\beta$ A1746U, realizamos un ensayo de replicación viral en presencia de AZC y de cada nucleósido no mutagénico (Figura 5.20).

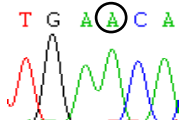
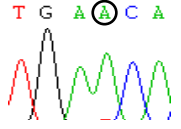
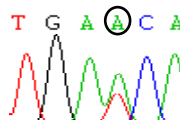
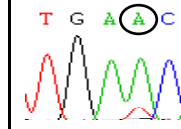


**Figura 5.20. Replicación del mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de AZC y nucleósidos no mutagénicos.** El proceso de replicación viral se realizó para el mutante infeccioso indicado infectando  $10^8$  bacterias con  $10^4$  ufp del virus en 1 ml y en ausencia o presencia de AZC (60  $\mu$ g/ml) y el doble de la concentración molar de nucleósidos no mutagénicos (491.4  $\mu$ M). Las diferentes condiciones experimentales se indican debajo de cada columna. Las barras de error representan la desviación estándar de los valores de los títulos obtenidos en un ensayo realizado por duplicado.

Los resultados mostraron que el efecto inhibitorio producido por el AZC revertía en presencia de un exceso de pirimidinas, pero no lo hacía en presencia de un exceso de purinas, al igual que ocurría con los mutantes Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C (Figura 5.15). Estos resultados nos hicieron suponer que la ventaja selectiva que presenta la mutación A1746U en presencia de AZC desaparecería en presencia de un exceso de pirimidinas. Para comprobarlo se realizaron ensayos de competición entre el virus salvaje Q $\beta$ wt y el mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de AZC y de cada uno de los nucleósidos no mutagénicos y se analizó la secuencia consenso de las poblaciones obtenidas (**Tabla 5.14**). Las competiciones realizadas en presencia de AZC y nucleósidos pirimidínicos (AZC+Cy o AZC+Ur) mostraron que el virus salvaje dominaba en la población después de 5 pases, mientras que las realizadas en presencia de AZC+Gu o AZC+Ad mostraron una mezcla del nucleótido salvaje y el mutado en la posición 1746. Para comprobar si en los dos últimos casos se llegaba a imponer alguno de los dos virus, se dieron 5 pases adicionales y se determinaron las secuencias consenso de las nuevas poblaciones obtenidas, mostrando que los dos virus seguían coexistiendo en la población (**Tabla 5.14**). Los resultados obtenidos en estos experimentos muestran que la ventaja selectiva que presenta la mutación A1746U en presencia de AZC desaparece en presencia de pirimidinas y se reduce en presencia de purinas, de forma similar a lo que ocurre en los experimentos del mismo tipo realizados con

los mutantes Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C cuyas mutaciones están situadas en la replicasa (Tabla 5.10). Aunque el efecto entre las mutaciones es similar, las bases moleculares del aumento de la resistencia al AZC causado por la mutación A1746U probablemente son diferentes, algo que ya se intuye al observar que la frecuencia de mutación máxima de la población obtenida a partir del mutante Q $\beta$ A1746U no difiere significativamente de la obtenida a partir del virus salvaje (Figura 5.19).

**Tabla 5.14. Competición entre el virus Q $\beta$ wt y el mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de AZC y nucleósidos no mutagénicos.**

Competición	Q $\beta$ wt + Q $\beta$ A1746U			
Condición <sup>1</sup>	AZC+Cy	AZC+Ur	AZC+Gu	AZC+Ad
N pase	p5	p5	p10	p10
Cromatograma				
Secuencia consenso <sup>2</sup>	A	A	A+T(U)	A+T(U)

<sup>1</sup> Los ensayos de competin se realizaron infectando inicialmente 10<sup>9</sup> bacterias *Hfr* con 10<sup>6</sup> ufp de cada virus competidor en presencia de AZC (60  $\mu$ g/ml) y del doble de la concentración molar para cada nucleósido (491.4  $\mu$ M) (ver apartado 4.7.3 de Materiales y Métodos).

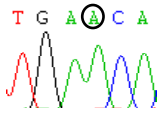
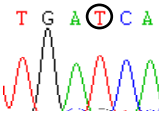
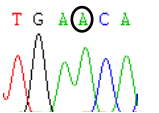
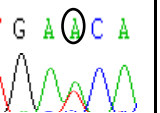
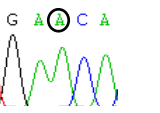
<sup>2</sup> nicamente se analizó la posición 1746 (que se muestra enmarcada por un círculo encima de los cromatogramas).

#### 5.6.4 Valor selectivo del mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de agentes mutagénicos diferentes al AZC

Para poder comparar el comportamiento de la mutación A1746U con el de las mutaciones en la replicasa, A2982G y U3582C, estudiamos también el valor selectivo del mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de Rib y 5-FU. Para ello se realizó un ensayo de competin entre el virus Q $\beta$ wt y el mutante infeccioso Q $\beta$ A1746U en presencia de 75  $\mu$ g/ml de 5-FU o 500  $\mu$ M de Rib. Los resultados obtenidos a pase número 5 mostraron que en presencia de Rib el mutante fue desplazado por el virus salvaje, mientras que en presencia de 75  $\mu$ g/ml de 5-FU siguió habiendo una mezcla de ambos nucleótidos en la secuencia consenso de la población. La realización de pases adicionales a una concentración de 100  $\mu$ g/ml de 5-FU mostró la imposición del nucleótido salvaje a pase número 15 (**Tabla 5.15**). Estos resultados son similares a los obtenidos en las competencias entre los mutantes Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C con el virus salvaje en presencia de Rib y a los obtenidos en la competin entre el mutante Q $\beta$ A2982G y el virus salvaje en presencia de 5-FU (Tabla 5.12).



**Tabla 5.15. Ensayos de competición entre el virus salvaje y el mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de AZC, Rib o 5-FU.**

Competición	Q $\beta$ wt + Q $\beta$ A1746U				
Condición <sup>1</sup>	No tratada	AZC (60 $\mu$ g/ml)	Rib (500 $\mu$ M)	5-FU (75 $\mu$ g/ml)	5-FU (100 $\mu$ g/ml) <sup>3</sup>
Nº pase	p5	p5	p5	p5	p15
Cromatograma					
Secuencia consenso <sup>2</sup>	A	T (U)	A	A+T(U)	A

<sup>1</sup> Los ensayos de competición se realizaron infectando inicialmente  $10^9$  bacterias *Hfr* con  $10^4$  ufp de cada virus competidor manteniendo una moi de 1 en el resto de los pases (apartado 4.6.3 de Materiales y Métodos).

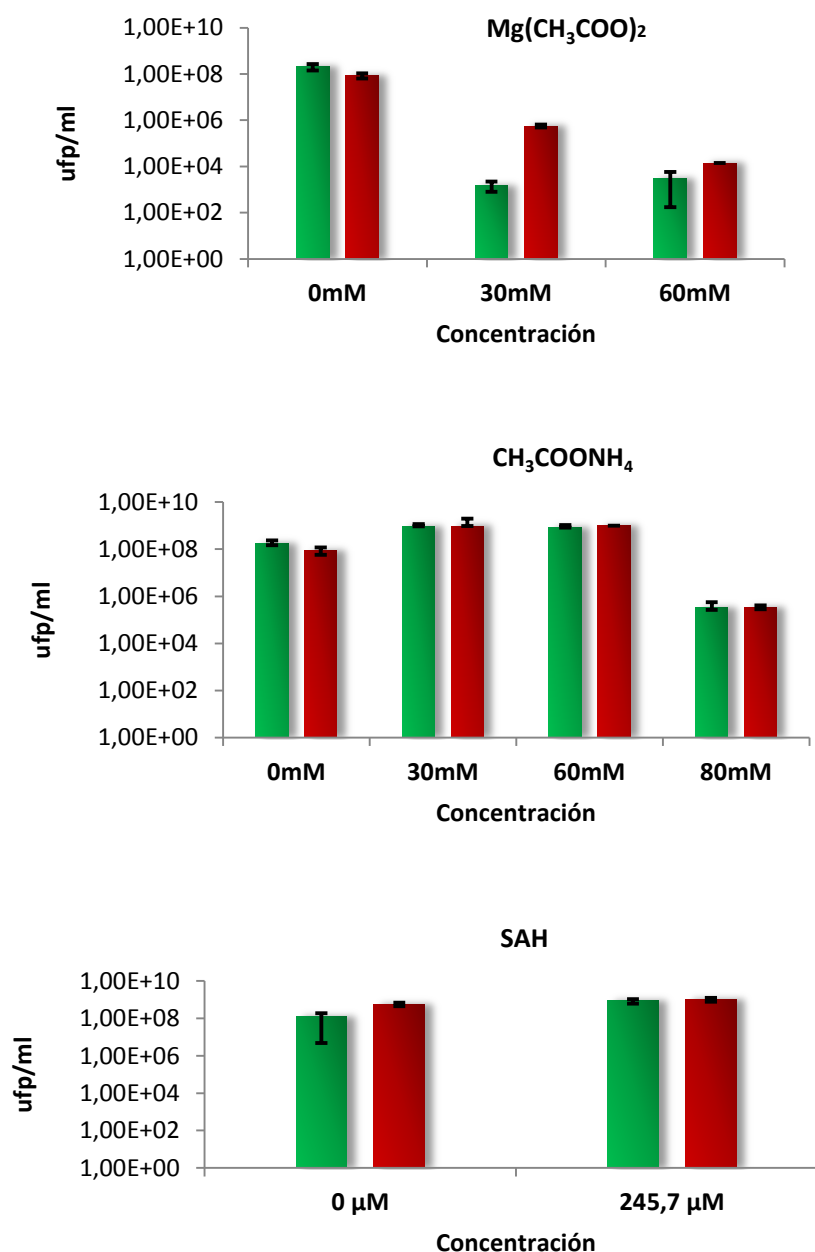
<sup>2</sup> Únicamente se analizó la posición 1746 (que se muestra enmarcada por un círculo encima de los cromatogramas).

<sup>3</sup> La sucesión de pases realizados a 100  $\mu$ g/ml de 5-FU se llevó a cabo a partir del pase p5 procedente de la competición en presencia de 75  $\mu$ g/ml de 5-FU.

### 5.6.5 Estudio del valor selectivo que presenta la mutación A1746U en presencia de agentes hipometilantes

Los resultados presentados en el apartado 5.6.1 muestran que la mutación A1746U no modifica la frecuencia de mutación del bacteriófago Q $\beta$  en presencia de AZC, lo cual nos indujo a pensar que posiblemente su ventaja selectiva podría estar relacionada con otros efectos del AZC diferentes del mutagénico. Está descrito que el AZC también posee una fuerte acción hipometilante (Jones y Taylor 1980, Stresemann y Lyko 2008), la cual podría alterar diversas funciones celulares que limitarían la replicación viral. Existen diversos estudios que relacionan las modificaciones de los tRNAs (Brahmachari y Ramakrishnan 1984, Motorin y Helm 2011) y la hipometilación de los factores de terminación de la síntesis proteica (Dinçbas-Renqvist y col. 2000, Mora y col. 2007) con el incremento de la lectura errónea de codones de terminación y, por tanto, con el aumento en la expresión de proteínas *readthrough*. Dado que la proteína A1 se sintetiza cuando el codón de terminación de la proteína de cubierta se lee erróneamente, pensamos que su expresión podría verse incrementada como consecuencia del efecto hipometilante del AZC. En ese caso, el mecanismo de acción de la mutación A1746U podría consistir en restaurar los niveles normales de proteína A1. Con el objetivo de estudiar esta posibilidad, determinamos si la mutación A1746U también presentaba valor selectivo en presencia de otros agentes con reconocida acción hipometilante como  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (Leboy 1971) o SAH (De Cabo y col. 1994, Glick y col. 1975). Para ello, en primer

lugar realizamos un ensayo de replicación de los virus Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U en presencia de SAH y diferentes concentraciones de  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  y  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (Figura 5.21). Los resultados mostraron que el  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  y el  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  disminuían la tasa de crecimiento de ambos virus, aunque el mutante presentaba títulos mayores que el virus salvaje en presencia de  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . En presencia de SAH no se observó disminución de la tasa de crecimiento de ninguno de los dos virus.

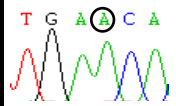
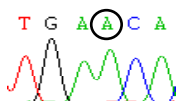
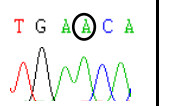
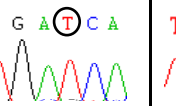



**Figura 5.21. Replicación del virus Q $\beta$ wt y el mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de compuestos hipometilantes.** Los ensayos se hicieron infectando  $10^8$  células con  $10^4$  ufp para cada virus y condición. Las barras verdes corresponden al virus Q $\beta$ wt, y las rojas al mutante Q $\beta$ A1746U. Las concentraciones añadidas de cada compuesto se indican debajo de cada columna. La única concentración de SAH elegida corresponde a la concentración molar equivalente a 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de

AZC. Las barras de error indican la desviación estándar de los valores de los títulos obtenidos en un ensayo llevado a cabo por duplicado.

A continuación realizamos ensayos de competición entre el virus salvaje Q $\beta$ wt y el mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de estos mismos compuestos y también de dAZC, la cual posee la misma estructura química que el AZC excepto por la presencia del grupo OH en el desoxinucleótido. El dAZC también posee acción hipometilante, pero no es esperable que actúe como mutágeno para el RNA (Christman 2002). La determinación de la secuencia consenso de las poblaciones obtenidas a pase número 5 mostró que tanto en presencia de dAZC como de SAH el virus salvaje se imponía en la población (**Tabla 5.16**). Los resultados negativos obtenidos con el dAZC pueden explicarse debido a que su acción hipometilante ocurre únicamente a nivel del DNA (Creusot y col. 1982), mientras que la del AZC posiblemente ocurre también a nivel del RNA (Li y col. 1970, Lu y Randerath 1979, 1980) y, por tanto, en presencia de dAZC la mutación A1746U podría no ofrecer ventaja si sus efectos estuvieran relacionados con los niveles de metilación de algún tipo de RNA. Dado que el SAH no inhibe la replicación de ninguno de los dos virus, podría no estar ejerciendo presión selectiva sobre ellos y, por tanto, la mutación A1746U que tiene un coste en *fitness* respecto al virus salvaje (Figura 5.6) sería seleccionada en contra. Estos resultados contrastan con los obtenidos en las competiciones llevadas a cabo en presencia de Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, en las cuáles el mutante se impuso o se mantuvo como mezcla (**Tabla 5.16**), indicando que en presencia de estas sales hipometilantes la mutación A1746U sí presenta una clara ventaja.

**Tabla 5.16. Ensayos de competición entre el virus salvaje y el mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de AZC y diferentes compuestos hipometilantes.**

Competición <sup>1</sup>	Q $\beta$ wt + Q $\beta$ A1746U				
Condición	No tratada	dAZC (245,7 $\mu$ M)	SAH (245,7 $\mu$ M)	Mg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> (30mM) <sup>2</sup>	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (80mM) <sup>2</sup>
Nº pase	p5	p5	p5	p5	p5
Cromatograma					
Secuencia consenso <sup>3</sup>	A	A	A	T(U)	A+T(U)

<sup>1</sup> Los ensayos se iniciaron infectando 10<sup>9</sup> bacterias con 10<sup>5</sup> ufp de cada virus competidor en presencia de SAH y Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>. Las competiciones en presencia de dAZC y CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> se iniciaron infectando 10<sup>8</sup> bacterias con 10<sup>5</sup> ufp de cada virus. Los pases siguientes se realizaron manteniendo una moi de entre 0,01 y 0,1. En todos los casos se hizo un experimento en paralelo en ausencia de cualquier compuesto.

<sup>2</sup> Se eligió la concentración de 30mM para el Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> por ser la que presentaba mayor diferencia entre ambos mutantes y de 80 mM para el CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> por ser la única en la que se observaba inhibición de la replicación.

<sup>3</sup> Únicamente se analizó la posición 1746 (que se muestra enmarcada por un círculo encima de los cromatogramas).

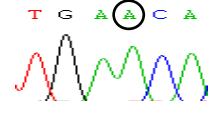
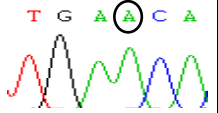
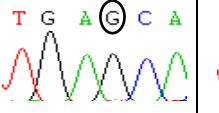
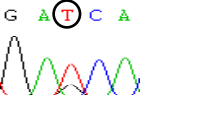
#### 5.6.6 Efecto del nucleótido inmediatamente posterior al codón de terminación UGA sobre la expresión de la proteína A1

Como ya se ha mencionado, la secuencia de nucleótidos anterior o posterior a los codones de terminación que preceden a proteínas *readthrough* (Firth y col. 2011, Buckingham y col. 1990) puede afectar a la propia supresión de estos codones (ver apartado 2.7.2 de Introducción). Este hecho podría indicar que, dependiendo del tipo de nucleótido que se encuentre localizado en la posición 1746, habrá un porcentaje mayor o menor de continuación de la traducción (Fluck y col. 1977, Feinstein y Altman 1978), y por tanto, de expresión de la proteína A1.

Para investigar esta posibilidad, creamos por mutagénesis dirigida el mutante Q $\beta$ A1746G, en el que el nucleótido A de la posición 1746 se cambiaba por G en lugar de por U. A continuación, para analizar si este cambio también aporta una ventaja al virus en presencia de AZC, realizamos ensayos de competición entre el mutante y el virus salvaje y entre los 2 mutantes infecciosos, Q $\beta$ A1746U y Q $\beta$ A1746G (**Tabla 5.17**). En el caso de la competición entre el virus salvaje y el nuevo mutante, tanto en presencia como en ausencia de AZC, fue el virus salvaje el que se impuso después de 5 pases, indicando que la mutación posee un coste en *fitness* en ambas condiciones. En la competición entre ambos mutantes en ausencia de AZC se impuso el mutante Q $\beta$ A1746G indicando que su coste en *fitness* en estas condiciones es menor

que el de la mutación A1746U. La competición entre los 2 mutantes en presencia de AZC mostró mezcla de ambos nucleótidos, aunque el U estaba en mayor proporción (**Tabla 5.17**). El hecho de que ambos mutantes coexistan en presencia de AZC, al menos durante 5 pases, sugiere que la mutación A1746G sí debe aportar alguna ventaja al virus en estas condiciones, ya que de otro modo habría sido totalmente desplazada por la mutación A1746U, al igual que sucede cuando el virus competidor es el salvaje (Tabla 5.3).

**Tabla 5.17. Competiciones realizadas entre los virus Q $\beta$ wt, Q $\beta$ A1746U y Q $\beta$ A1746G.**

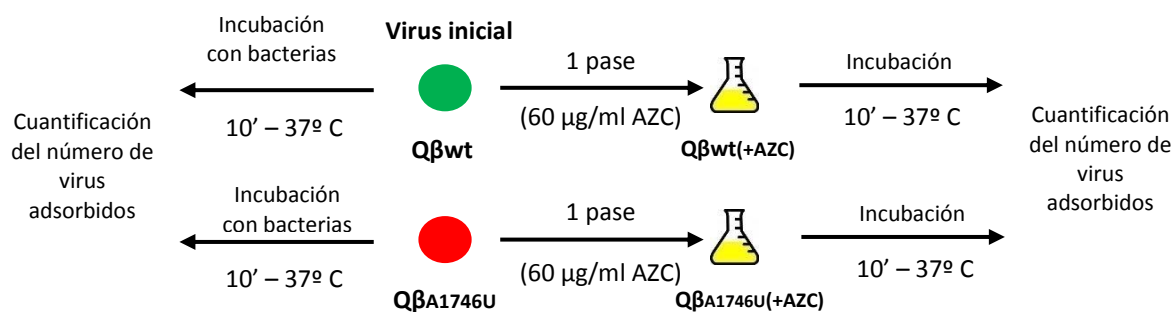
Competición <sup>1</sup>	Q $\beta$ wt + Q $\beta$ A1746G		Q $\beta$ A1746U + Q $\beta$ A1746G	
Condición	No tratada	AZC (60 $\mu$ g/ml)	No tratada	AZC (60 $\mu$ g/ml)
Nº pase	p5	p5	p5	p5
Cromatograma				
Secuencia consenso <sup>2</sup>	A	A	G	T(U)+G

<sup>1</sup> Se realizaron dos ensayos en paralelo para cada competición y condición infectando inicialmente 10<sup>9</sup> bacterias con 10<sup>5</sup> ufp de cada virus competidor y manteniendo una moi de 0,01 a lo largo de los pases.

<sup>2</sup> Únicamente se analizó la posición 1746 (que se muestra enmarcada por un círculo encima de los cromatogramas).

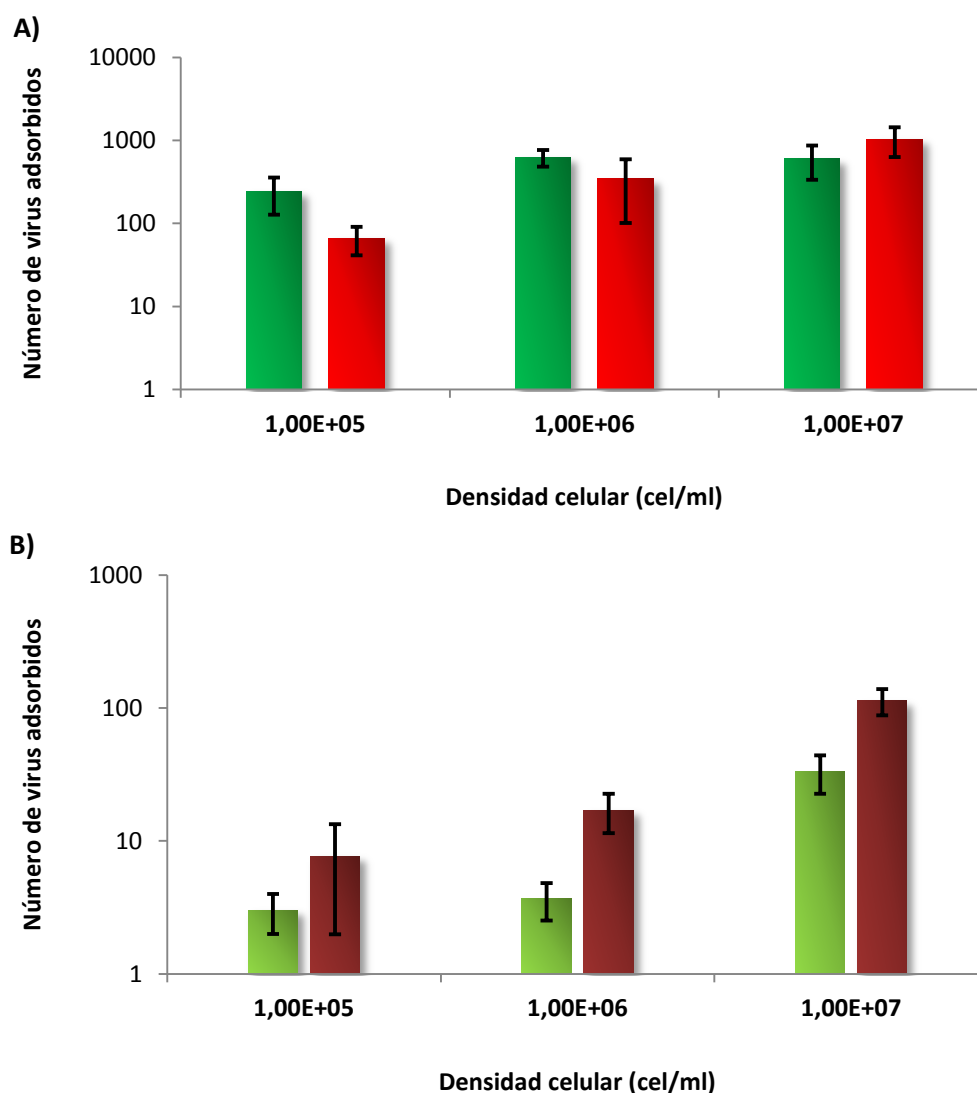
### 5.6.7 Adsorción del virus Q $\beta$ wt y el mutante Q $\beta$ A1746U a las bacterias hospedadoras

Dado que la proteína A1 se localiza en la cápsida viral, es posible que cualquier alteración en sus niveles de expresión pudiera afectar a la estructura del virus modificando su capacidad de adsorción a los *pili* bacterianos. Para investigar esta posibilidad determinamos la tasa de adsorción de los virus clonales Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U y de dos poblaciones generadas a partir de la replicación de los mismos en presencia de AZC (**Figura 5.22**). Dado que la tasa de adsorción viral puede variar dependiendo de la concentración bacteriana, el experimento se realizó utilizando varias densidades celulares. Estos ensayos se realizaron en colaboración con María Noel Pereira del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva de Valencia.



**Figura 5.22. Determinación de la tasa de adsorción de los virus Qβwt y QβA1746U y las poblaciones obtenidas después de su replicación en presencia de AZC.** Los ensayos se realizaron infectando distintas cantidades de bacterias *E.coli* Hfr ( $10^5 - 10^6 - 10^7$ ) con  $10^5$  ufp de cada virus en un ensayo llevado a cabo por triplicado. Después de 10 minutos de incubación a 37° C y con agitación a 300 rpm los cultivos se trataron tal y como se describe en el apartado 4.6.4 de Materiales y Métodos. El *pellet* obtenido se resuspendió y se plaqueó para determinar la cantidad total de virus adsorbidos.

Los resultados mostraron que en el caso de los virus originales Qβwt y QβA1746U, no tratados con AZC, se adsorbía mayor cantidad de virus salvaje que del mutante a baja densidad celular. Por el contrario, después de la replicación en presencia de AZC se adsorbía mejor el mutante QβA1746U que el virus salvaje a las tres densidades celulares ensayadas (**Figura 5.23**). Hay que destacar, sin embargo, que en todos los casos la replicación previa en presencia de AZC, ejerció una fuerte inhibición en la capacidad del virus para fijarse a la bacteria hospedadora. Los valores obtenidos para la tasa de adsorción ( $\alpha$ ) en función de la densidad celular se muestran en la **Tabla 5.18**.



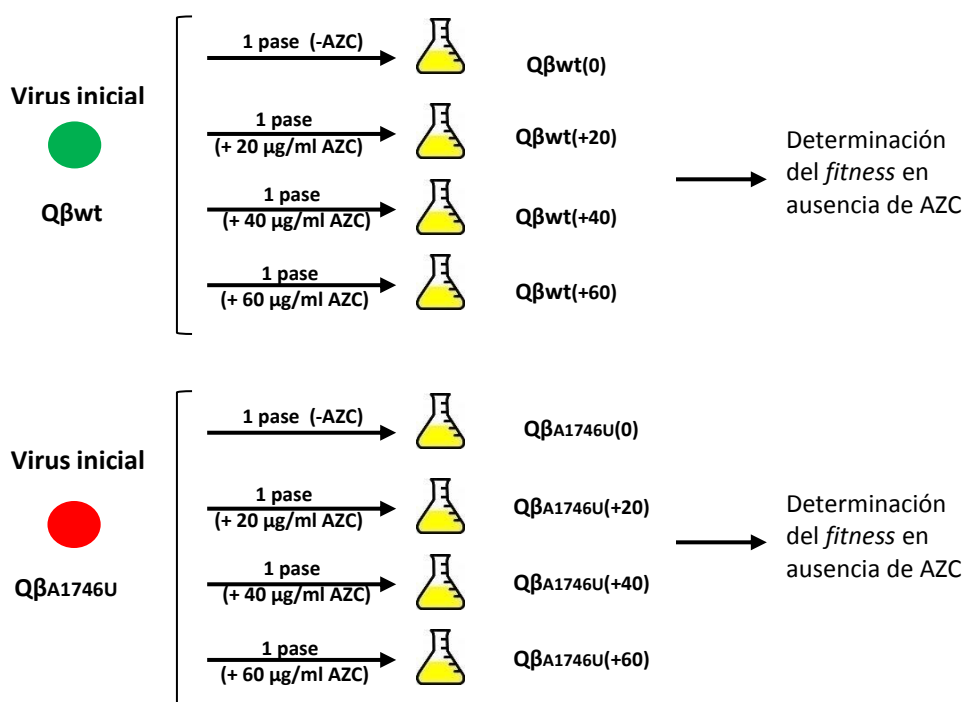
**Figura 5.23. Adsorción del bacteriófago Qβ en función de la densidad celular. A)** Ensayo realizado con los virus Qβwt (columnas verdes) y el mutante QβA1746U (columnas rojas). **B)** Ensayo realizado con las poblaciones generadas tras la replicación de los virus Qβwt (columnas verdes) y QβA1746U (columnas rojas) en presencia de AZC. La concentración de AZC utilizada para obtener estas poblaciones fue de 60 µg/ml (ver leyenda de la Figura 5.22). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los títulos obtenidos en tres réplicas realizadas para cada condición.

**Tabla 5.18. Tasa de adsorción de los virus Qβwt y QβA1746U en función de la densidad celular.**

Virus	Densidad celular		
	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
Qβwt	0,0024	0,0064	0,0061
Qβwt(+AZC)	3,00x10 <sup>-5</sup>	3,66x10 <sup>-5</sup>	3,33x10 <sup>-4</sup>
QβA1746U	0,0006	0,0052	0,0109
QβA1746U(+AZC)	7,66x10 <sup>-5</sup>	1,70x10 <sup>-4</sup>	0,0011

### 5.6.8 *Fitness* de las poblaciones generadas tras la replicación de los virus Q $\beta$ wt y el mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de AZC

A continuación se determinó si la replicación previa del bacteriófago Q $\beta$  durante un único pase en presencia de AZC también era capaz de reducir el *fitness* del virus en condiciones estándar, al igual que sucedía con la tasa de adsorción. Para ello los virus Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U se replicaron durante un pase en presencia de distintas concentraciones de AZC y las poblaciones obtenidas fueron ensayadas para determinar su *fitness* en ausencia de AZC (**Figura 5.24**).

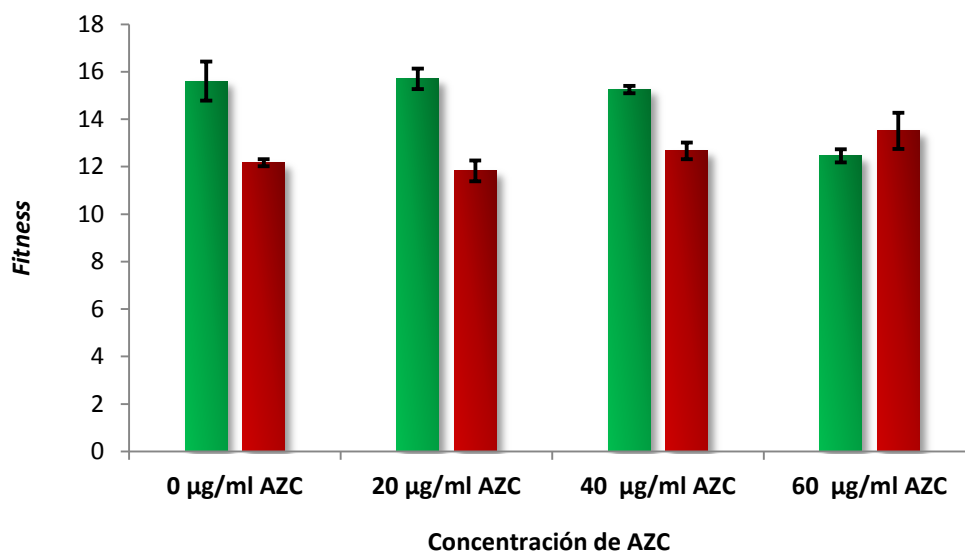


**Figura 5.24. Determinación del *fitness* de poblaciones virales que han replicado previamente en presencia de AZC.** Los virus Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U se replicaron durante un pase a un *moi* de 0,01 en un volumen de 10 ml en presencia de distintas concentraciones de AZC. Las poblaciones obtenidas se ensayaron para determinar su *fitness* en condiciones estándar en ausencia de AZC (ver apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Los resultados mostraron que la población obtenida tras la replicación del virus salvaje en presencia de 60  $\mu$ g/ml de AZC presentaba menor *fitness* que la población obtenida tras la replicación del mismo virus en ausencia o a concentraciones menores de AZC. Sin embargo, en el caso del mutante Q $\beta$ A1746U no se observó este descenso, sino que incluso fue posible detectar un ligero aumento del *fitness*, llegando a ser superior que el del virus salvaje después



de la replicación en presencia de 60  $\mu\text{g/ml}$  de AZC (**Figura 5.25**). Estos resultados proporcionan una posible explicación para el hecho de que el mutante Q $\beta$ A1746U se imponga al virus salvaje en los ensayos de competición realizados en presencia de AZC (Tabla 5.3), a pesar de tener menor *fitness* (Figura 5.6). También muestran que la ventaja del mutante solo sería observable cuando ha replicado previamente en presencia de AZC, tal y como ocurre en los ensayos de competición por tener lugar durante varios pases.

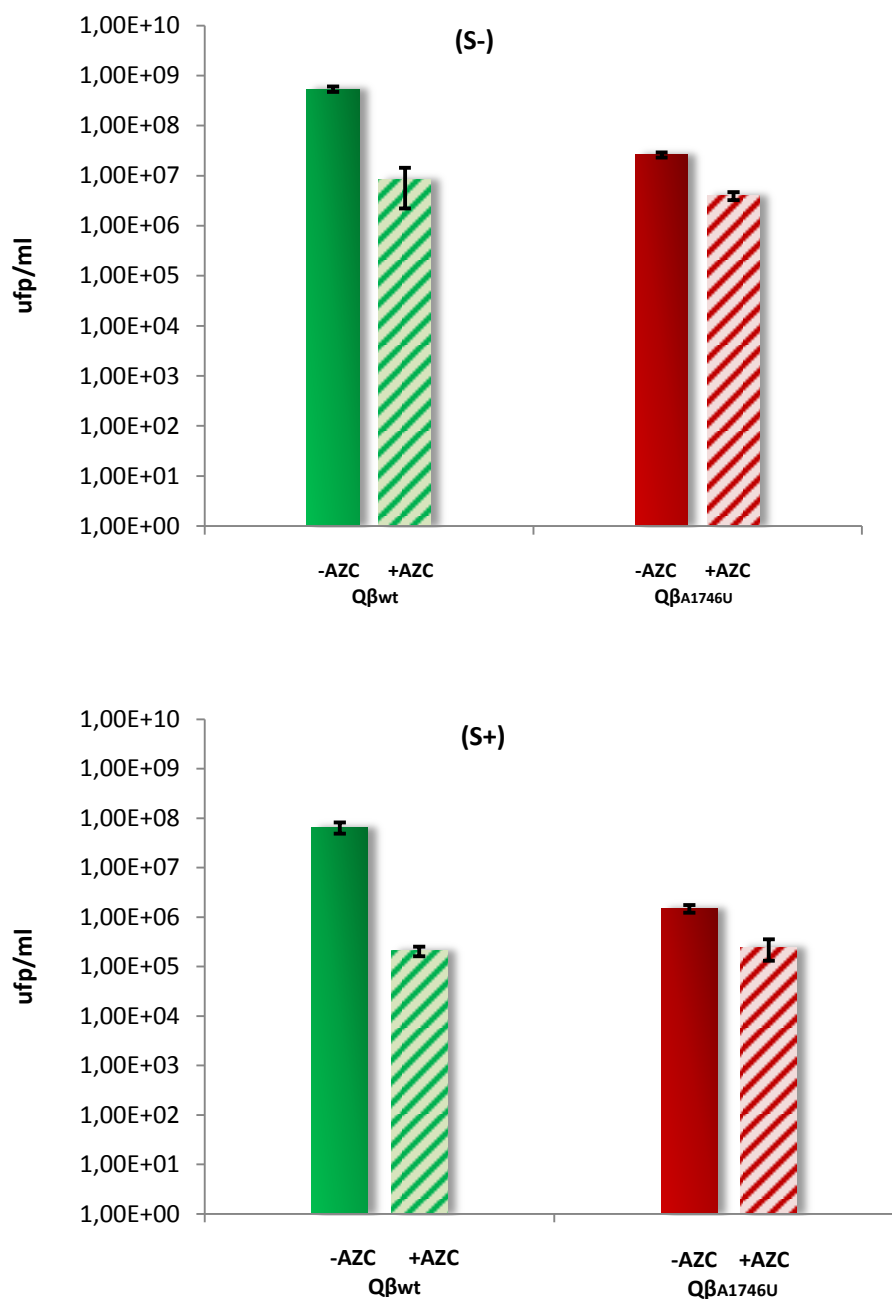


**Figura 5.25. *Fitness* absoluto del virus salvaje y el mutante Q $\beta$ A1746U replicados previamente en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de AZC.** Las determinaciones se realizaron según se describe en el apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos. El *fitness* absoluto se calculó como el logaritmo en base 2 de la tasa de replicación. Las columnas verdes corresponden a los valores obtenidos para el virus Q $\beta$ wt, mientras que las columnas rojas corresponden a los obtenidos para el mutante Q $\beta$ A1746U. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias de los valores obtenidos en un ensayo llevado a cabo por triplicado para cada condición.

#### 5.6.9 Valor selectivo de la mutación A1746U en una cepa supresora de codones UGA

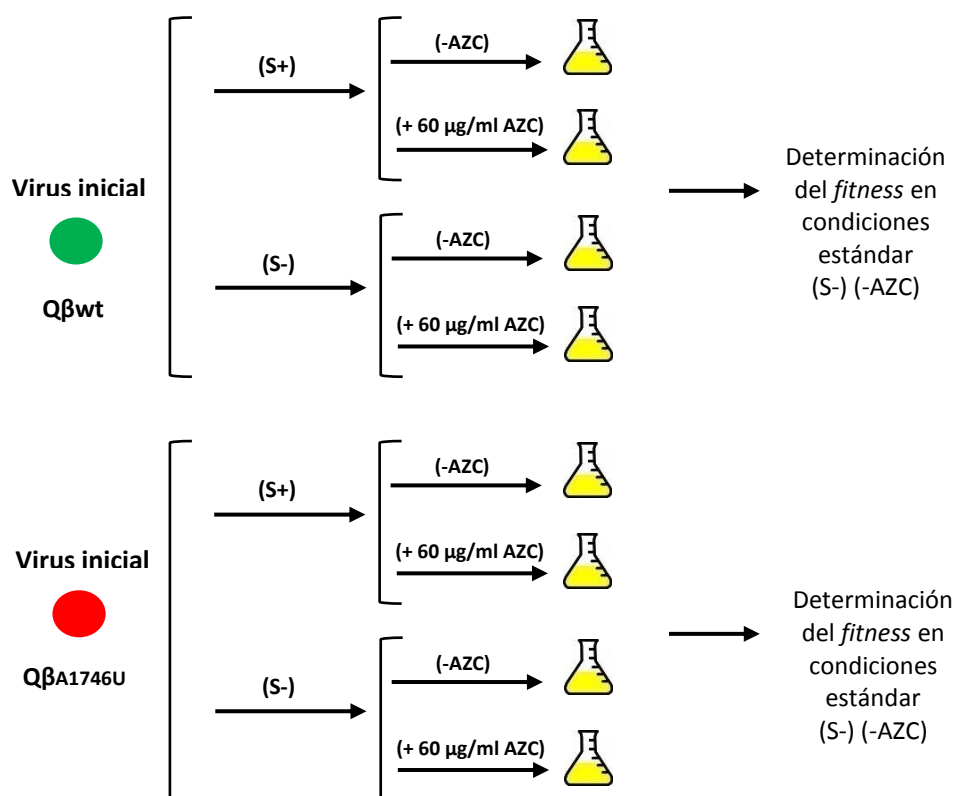
Según nuestra hipótesis, la ventaja aportada por la mutación A1746U consistiría en restaurar el nivel de proteína A1 que estaría incrementado por la presencia de AZC. Si esto es correcto, el mutante Q $\beta$ A1746U también podría estar favorecido frente al virus salvaje durante la infección de cepas bacterianas supresoras de codones UGA, en las cuales la expresión de la proteína A1 estaría incrementada. Para comprobarlo, analizamos el comportamiento de los virus Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U en la cepa supresora de codones UGA, *G240R4*, que denominaremos (S+), en ausencia y presencia de 60  $\mu\text{g/ml}$  de AZC y lo comparamos con el comportamiento de estos mismos virus en las bacterias utilizadas habitualmente, que por ser no supresoras,

denominaremos (S-). Los resultados mostraron que la replicación en bacterias (S+) disminuía los títulos obtenidos por ambos virus en aproximadamente un orden de magnitud (**Figura 5.26**).



**Figura 5.26. Títulos virales obtenidos durante la replicación de los virus Qβwt y QβA1746U en bacterias (S+) y (S-).** El ensayo se realizó infectando  $10^8$  bacterias de uno u otro tipo con  $10^4$  ufp de cada virus. Después de 2 horas de incubación a 37° C los sobrenadantes se plaquearon en bacterias (S-) para determinar el título viral. Las columnas verdes corresponden al virus Qβwt y las rojas corresponden al virus mutante QβA1746U. La replicación se realizó en ausencia (-AZC) o presencia de 60 µg/ml de AZC (+AZC). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media de los títulos virales para cada virus y condición en un ensayo llevado a cabo por triplicado.

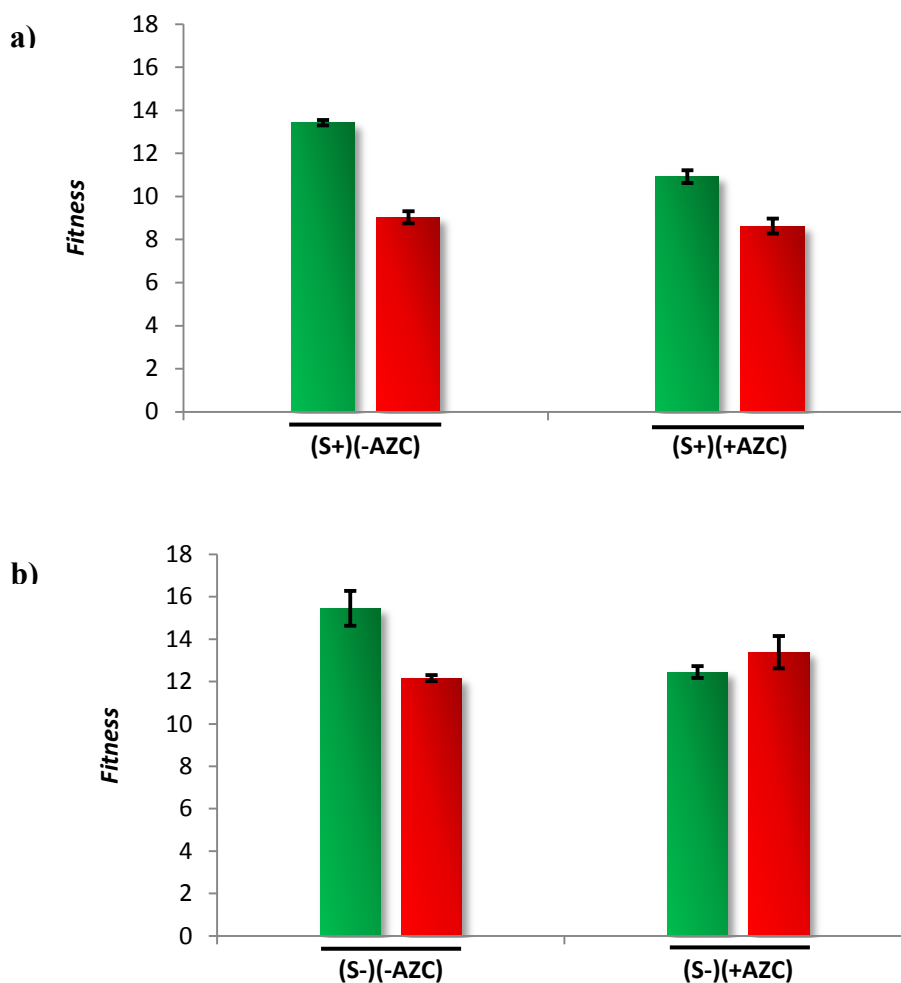
Con objeto de comprobar si, al igual que sucedía en presencia de AZC (Figura 5.25), la replicación en bacterias supresoras afecta a la replicación posterior del virus, determinamos los valores de *fitness* en condiciones estándar de las poblaciones obtenidas tras la replicación de los virus Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U en bacterias (S+) y (S-) (Figura 5.27).



**Figura 5.27. Ensayo de determinación del *fitness* de los virus Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U replicados previamente en bacterias (S+) y (S-).** El ensayo se realizó por triplicado a partir de las poblaciones clonales de los virus Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U infectando inicialmente  $10^8$  bacterias de uno u otro tipo con  $10^4$  ufp de cada virus y en ausencia o presencia de 60  $\mu$ g/ml de AZC. A partir de las poblaciones obtenidas se realizó un ensayo de *fitness* en las condiciones estándar (ver apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos).

Los resultados mostraron que en todos los casos el *fitness* de las poblaciones obtenidas tras la replicación en bacterias (S-) fue superior al *fitness* de las poblaciones obtenidas tras la replicación en bacterias (S+) (Figura 5.28). La relación entre los valores de *fitness* del virus Q $\beta$ wt y el mutante Q $\beta$ A1746U replicados previamente en bacterias (S+) mostró que tanto en ausencia como en presencia de AZC el virus salvaje presentaba ventaja con respecto al mutante (Tabla 5.19 y Figura 5.28a). Por el contrario, cuando la replicación previa a

las determinaciones del *fitness* había tenido lugar en bacterias (S-), el virus salvaje solo presentaba ventaja si la replicación se había realizado en ausencia de AZC, mientras que en presencia de AZC era el mutante Q $\beta$ A1746U el que superaba al virus salvaje (Tabla 5.19 y Figura 5.28b). Estos resultados muestran claramente que la ventaja del mutante Q $\beta$ A1746U solo se manifiesta en bacterias (S-) en presencia de AZC, lo que contradice la hipótesis de que el incremento de la proteína A1 que debe tener lugar en bacterias (S+) constituye una presión selectiva similar a la ejercida por el AZC.



**Figura 5.28. *Fitness* absoluto de los virus Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U replicados previamente en bacterias (S-) y (S+).** Las determinaciones se realizaron según se describe en el apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos. El *fitness* absoluto se calculó como el logaritmo en base 2 de la tasa de replicación. Las columnas verdes corresponden a los valores obtenidos para el virus Q $\beta$ wt, mientras que las columnas rojas corresponden a los obtenidos para el mutante Q $\beta$ A1746U. Las condiciones a las que habían replicado previamente los virus se indican debajo de cada columna. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de las medias de los valores obtenidos en un ensayo llevado a cabo por triplicado.

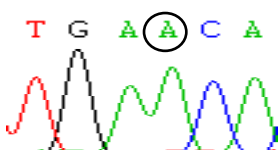
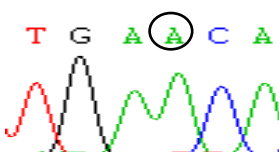
**Tabla 5.19. Relación entre los valores de *fitness* del virus Q $\beta$ wt y el mutante Q $\beta$ A1746U.**

Condición <sup>1</sup>	Relación Q $\beta$ wt/Q $\beta$ A1746U
(S-)(-AZC)	1,3
(S-)(+AZC)	0,9
(S+)(-AZC)	1,5
(S+)(+AZC)	1,3

<sup>1</sup> Condiciones de replicación previas a la determinación del *fitness* viral.

Otro modo de comprobar si la supresión del codón de terminación UGA aporta una ventaja a la mutación A1746U similar a la que se observa en presencia de AZC consiste en realizar ensayos de competición con el virus salvaje en bacterias supresoras (S+). La secuencia consenso de la población obtenida a pase número 5 (**Tabla 5.20**) mostró que en ausencia de AZC el nucleótido salvaje se impuso en la población, al igual que ocurría en las bacterias (S-). Por tanto, la presión selectiva ejercida durante la replicación en bacterias (S+) debe ser diferente o tener menor intensidad que la ejercida por el AZC en bacterias (S-).

**Tabla 5.20. Competición entre los virus Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U en células (S-) y (S+) en ausencia de AZC.**

Competición <sup>1</sup>	Q $\beta$ wt + Q $\beta$ A1746U	
Células	(S-)	(S+)
Condición	Ausencia de AZC	Ausencia de AZC
Nº pase	p5	p5
Cromatograma		
Secuencia consenso <sup>2</sup>	A	A

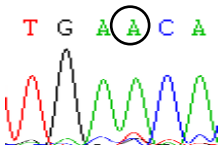
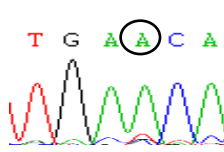
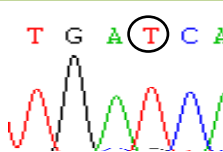
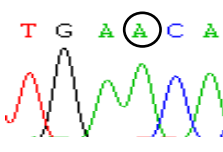
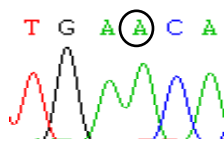
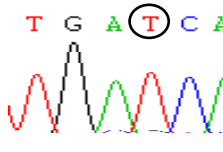
<sup>1</sup> Se realizaron dos ensayos en paralelo para cada competición y condición infectando inicialmente  $10^9$  bacterias con  $10^5$  ufp de cada virus competidor en un volumen de 10 ml y manteniendo una moi de 0,01 a lo largo de los pases.

<sup>2</sup> Únicamente se analizó la posición 1746 (que se muestra enmarcada por un círculo encima de los cromatogramas).

Una posible explicación para los resultados anteriores es que el exceso de proteína A1 en la cepa (S+) no es lo bastante elevado para favorecer la selección de la mutación A1746U en ausencia de AZC. Para analizar esta posibilidad realizamos ensayos de competición en bacterias (S+) y (S-) entre el virus salvaje Q $\beta$ wt y el mutante Q $\beta$ A1746U en presencia de diferentes concentraciones de AZC (10  $\mu$ g/ml, 20  $\mu$ g/ml y 60  $\mu$ g/ml), y analizamos la secuencia consenso de la población obtenida a pase número 5 (**Tabla 5.21**). Los resultados mostraron

que a las concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$  de AZC, el nucleótido mutante era totalmente desplazado por el salvaje en la cepa supresora, mientras que permanecía como polimorfismo en la cepa no supresora. Sin embargo, a la concentración de 60  $\mu\text{g/ml}$  de AZC, el mutante desplazaba al virus salvaje en ambos tipos de bacterias. Estos resultados indican que a altas concentraciones de AZC la ventaja selectiva del mutante Q $\beta$ A1746U es independiente del tipo de bacteria que infecta, y que a bajas concentraciones de AZC es menor en la cepa supresora que en la no supresora, de acuerdo con los valores de *fitness* obtenidos en la figura 5.28. Sin embargo, los resultados obtenidos refuerzan la idea de que el nivel de lectura errónea del codón de terminación de la proteína de cubierta y, por tanto, los niveles de proteína A1, influyen en el valor selectivo que presenta la mutación A1746U.

**Tabla 5.21. Competición entre los virus Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U en bacterias (S-) y (S+) en presencia de bajas concentraciones de AZC.**

Competición <sup>1</sup>	Q $\beta$ wt + Q $\beta$ A1746U		
Células	(S-)		
Condición	AZC (10 $\mu\text{g/ml}$ )	AZC (20 $\mu\text{g/ml}$ )	AZC (60 $\mu\text{g/ml}$ )
Nº pase	p5	p5	p5
Cromatograma			
Secuencia consenso <sup>2</sup>	A + U	A + U	U (T)
Células	(S+)		
Condición	AZC (10 $\mu\text{g/ml}$ )	AZC (20 $\mu\text{g/ml}$ )	AZC (60 $\mu\text{g/ml}$ )
Nº pase	p5	p5	p5
Cromatograma			
Secuencia consenso <sup>2</sup>	A	A	U (T)

<sup>1</sup> Los ensayos se hicieron en paralelo para cada competición y condición infectando inicialmente  $10^8$  bacterias con  $10^5$  ufp de cada virus competidor en un volumen de 1 ml y manteniendo una moi de 1 para los pases realizados en presencia de 60  $\mu\text{g/ml}$  de AZC, e infectando inicialmente  $10^8$  bacterias y con  $10^4$  ufp de cada virus competidor en un volumen de 1 ml y manteniendo una moi de 0,01 para los pases realizados en presencia de 10 o 20  $\mu\text{g/ml}$  de AZC.

<sup>2</sup> Únicamente se analizó la posición 1746 (que se muestra enmarcada por un círculo encima de los cromatogramas).

## DISCUSIÓN

---

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 La estructura en cuasiespecies permite la selección de mutantes resistentes a los tratamientos con análogos de nucleósidos mutagénicos

Los virus RNA replican con unas tasas de error varios órdenes de magnitud más altas que las de los virus DNA o el DNA celular (Batschelet y col. 1976, Echols y Goodman 1991, Domingo 2007, Drake y Holland 1999, Kunkel y Alexander 1986, Sanjuán y col. 2010). Este hecho, unido a sus cortos tiempos de generación, su alta capacidad de propagación y sus altos tamaños poblacionales, hace que presenten una amplia diversidad genética que les permite adaptarse de forma rápida a los cambios ambientales (ver apartado 2.2.2 de Introducción). Esta elevada capacidad de adaptación dificulta el control de las enfermedades causadas por los virus RNA, al no poder ser controladas de manera efectiva como consecuencia de la generación de mutantes de resistencia frente a la mayoría de los tratamientos. La dinámica de cuasiespecies permite, sin embargo, abrir nuevos caminos para el diseño de estrategias antivirales más efectivas que eviten la generación de mutaciones de resistencia. Entre ellas se ha propuesto el tratamiento con agentes mutagénicos que aumentan de forma artificial la tasa de error del virus provocando una disminución de la infectividad y pudiendo producir en último término la extinción de la población. Esto es lo que se conoce como mutagénesis letal (Loeb y col. 1999), ampliamente documentada en estudios *in vitro* e *in vivo* (Airaksinen y cols. 2003, Ruiz-Jarabo y cols. 2003, Tapia y cols. 2005) (ver apartado 2.4 de Introducción). Debido a la acción limitada de la selección natural en estas condiciones, la extinción de las poblaciones virales a través de los tratamientos mutagénicos estaría asociada al incremento de la frecuencia de mutación en el espectro de mutantes sin la fijación de nuevas mutaciones en la secuencia consenso. Este hecho, al menos en teoría, proporcionaría a la mutagénesis letal la ventaja de hacer más difícil la selección de mutantes de resistencia a mutágenos. Sin embargo, existen varios estudios que demuestran que la selección de este tipo de mutantes es posible (Vignuzzi y col. 2006, Domingo y col. 2012, Sadeghipour y col. 2013, Paff y col. 2014), lo cual hace necesario investigar las estrategias que lo minimicen. Una vía prometedora es la combinación de inhibidores y mutágenos, la cual ha demostrado ser más eficaz que el uso de cualquiera de los agentes por separado (Iranzo y cols. 2011, Lázaro 2014). Para hacer que las terapias basadas en la manipulación de la tasa de error puedan ser una realidad es preciso entender mejor las complejas interacciones entre mutantes y mutaciones dentro del espectro de mutantes y como estas pueden ser perturbadas a través de la adquisición de nuevas mutaciones.



En esta Tesis Doctoral se ha analizado el efecto que ejerce el AZC como agente mutagénico al aumentar la tasa de error durante la replicación del bacteriófago Q $\beta$ , prestando especial atención al estudio de las bases moleculares que podrían producir resistencia a este compuesto. Con este fin, se han seleccionado poblaciones virales que presentan una sensibilidad reducida al AZC, que son capaces de mantener su infectividad incluso cuando se alcanzan concentraciones de AZC que causan la extinción del virus salvaje (Arribas y col. 2011, Cases-González y col. 2008). Estas poblaciones presentan la fijación de la mutación A1746U y numerosos polimorfismos representados a alta frecuencia, lo cual nos ha permitido asociar el incremento de la resistencia al AZC a la ventaja selectiva que proporcionan ciertas mutaciones específicas.

Además de las mutaciones exclusivas de la presencia de AZC, en estas poblaciones se observó la fijación de la mutación A2187C, que también fue seleccionada en la línea evolucionada en ausencia de mutágeno. Esta mutación, por tanto, debe tener efectos beneficiosos independientes de la presencia de AZC. La fijación de este tipo de mutaciones beneficiosas también se ha demostrado en experimentos llevados a cabo con el fago T7 propagado en presencia de AZC (Springman y col. 2010), aunque el hecho de que este virus tenga un genoma de DNA puede dar lugar a diferencias respecto a la evolución del bacteriófago Q $\beta$ . Entre la gran cantidad de polimorfismos detectados en presencia de AZC destacan las mutaciones A2982C y U3582C localizadas en el gen de la replicasa, las cuales aportan ventajas en presencia de AZC y desventajas en su ausencia revirtiendo a pases tempranos en estas condiciones. Por otro lado, la fijación a pase 40 de la mutación A1746U se contradice con los valores de *fitness* que presenta el mutante infeccioso que contiene únicamente esta mutación, inferiores a los del virus salvaje. La mutación A1746U, localizada en una proteína no implicada en replicación, podría aportar resistencia al modular algún efecto diferente del mutagénico. La presencia simultánea de varias mutaciones que aportan ventaja selectiva en presencia de AZC podría hacernos pensar en la selección de diferentes mecanismos de resistencia. Además, la gran cantidad de pases a los que han sido sometidas las poblaciones analizadas en presencia de AZC, podría conducir a la selección de un mecanismo de resistencia basado en el incremento de la robustez genética, el cual implicaría una disminución del efecto deletéreo de las nuevas mutaciones incorporadas. Un estudio llevado a cabo con dos poblaciones de VSV que presentaban diferente robustez mutacional, mostró que la población más robusta redujo la dispersión de la distribución de *fitness*, aumentó la heterogeneidad genética y redujo la sensibilidad a la acumulación posterior de mutaciones en presencia de AZC o 5-FU (Sanjuán y col. 2007).

## 6.2 La evolución a alta tasa de error promueve la propagación simultánea de mutaciones beneficiosas

Nuestros resultados muestran una contradicción entre el valor selectivo que presentan varias de las mutaciones representadas a alta frecuencia en las poblaciones evolucionadas en presencia de AZC y, el hecho de que estas mutaciones no lleguen a fijarse en la secuencia consenso. Es el caso de las sustituciones polimórficas A2982G+A, U3582C+U y G3945A+G, las cuales permanecen como polimorfismos a lo largo de la serie de pases realizados en presencia de AZC y, sin embargo, deben ser beneficiosas en presencia de este compuesto, ya que presentan valores de *fitness* por encima del virus salvaje y consiguen desplazarlo cuando compiten con él. La mutación G3945A+G debe ser beneficiosa también en ausencia de AZC, ya que en estas condiciones consigue desplazar al virus salvaje y presenta valores de *fitness* superiores. La mutación C3413G+C, sin embargo, debe ser una mutación neutral, por presentar valores de *fitness* similares a los del virus salvaje y coexistir con él en las competencias realizadas tanto en presencia como en ausencia de AZC. Por último, el posible efecto beneficioso de la mutación U3989C+U podría depender del contexto mutacional en el que se encuentre, puesto que, aunque está representada a alta frecuencia, se comporta como deletérea tanto en presencia como en ausencia de AZC cuando está presente en el contexto mutacional del virus salvaje. Una posible explicación para esta elevada presencia de polimorfismos, es que cuando la tasa de error y el tamaño poblacional son muy elevados, como sucede en el caso de los virus RNA, se pueden generar nuevas mutaciones beneficiosas antes de que las que han aparecido previamente hayan llegado a fijarse, lo cual puede dar lugar a fenómenos de interacción entre ellas, retrasando su propagación en la población y, en algunos casos, impidiendo que puedan fijarse (Gerrish y Lenski 1998, Sniegowski y Gerrish 2010). Este tipo de interacciones que modifican el valor selectivo de las mutaciones se vio en diversos experimentos realizados con bacteriofagos, donde la propagación simultánea de mutaciones beneficiosas, que aparecen en el contexto genético de otras ya presentes, retrasa su fijación e incluso puede producir su eliminación (Betancourt 2009, Holder y Bull 2001, Wichman y col. 1999).

Además, hay que resaltar que las mutaciones beneficiosas que se generan en presencia de AZC probablemente lo hacen en contextos genéticos desfavorables, lo que puede conducir a la reducción de su ventaja selectiva (Orr 2000, Orr 2003, Wilke 2004). Los incrementos en la tasa de error también pueden distorsionar las interacciones que existen en el espectro de mutantes (Grande-Pérez y col. 2003), lo cual puede ser un factor adicional que contribuya a retrasar la fijación de algunas mutaciones beneficiosas. Las variaciones en el

efecto de las mutaciones dependiendo del contexto genómico, puede explicar el hecho de que las mutaciones A2982G y U3582C no aparezcan nunca juntas en el mismo genoma y que no se consiguiera generar el doble mutante conteniendo ambas mutaciones (ver apartado 5.4.2 de Resultados) debido a que esta combinación es letal o altamente deletérea para el virus, lo cual constituye un claro ejemplo de epistasis negativa. El hecho de que haya mutaciones beneficiosas que surgen en el contexto genético de otras aun no fijadas, junto con la diferente magnitud de los efectos que producen, podría ser explicado por el modelo teórico de interferencia completa (Park y Krug 2007).

### **6.3 Mecanismo molecular por el que las mutaciones localizadas en el gen de la replicasa confieren resistencia al AZC**

Un posible mecanismo por el cual el AZC podría ejercer su efecto mutagénico durante la replicación del bacteriófago Q $\beta$  es a través de su incorporación en lugar de citosina o uracilo durante la copia del RNA viral. En el caso de su incorporación durante la copia de la cadena positiva, podría dar lugar a transiciones A $\rightarrow$ G y G $\rightarrow$ A y transversiones C $\rightarrow$ G, entre otras, mientras que su incorporación durante la copia de la cadena negativa originaría transiciones U $\rightarrow$ C y C $\rightarrow$ U y transversiones G $\rightarrow$ C (Figura 5.13). Nuestros resultados muestran que el AZC incrementa la frecuencia de diferentes tipos de sustituciones en el bacteriófago Q $\beta$  aunque el efecto parece ser más marcado en las transiciones U $\rightarrow$ C y A $\rightarrow$ G y en las transversiones C $\rightarrow$ G. El hecho de que el AZC cuando entra en la célula bacteriana sea rápidamente desaminado a 5-azauridina (Cihak y Sorm 1965) explicaría su mayor incorporación como uracilo, resultado que concuerda con el hecho de que la transición U $\rightarrow$ C sea el tipo de cambio más observado (Tablas 5.9 y 5.13 de resultados). El incremento de las sustituciones C $\rightarrow$ G está de acuerdo con lo observado en estudios llevados a cabo con VLCM (Grande-Pérez y col. 2002). Sin embargo, contrasta con el efecto del AZC en VIH-1, donde preferiblemente se inducen transversiones G $\rightarrow$ C (Dapp y col. 2009). En ninguno de los casos citados se encontró un incremento en el porcentaje de sustituciones U $\rightarrow$ C y A $\rightarrow$ G. Una de las explicaciones para estas discrepancias puede ser que el AZC actúe de manera diferente dependiendo del sistema viral estudiado, debido a las diferencias entre el metabolismo celular procariota y eucariota o entre las polimerasas virales. En este sentido, nuestros resultados concuerdan con los efectos exhibidos por los virus VLCM y VFA tratados con 5-FU (Grande-Pérez y col. 2002, Sierra y col. 2000).

Para investigar los mecanismos de resistencia al AZC en el bacteriófago Q $\beta$  caracterizamos los efectos de dos de las mutaciones polimórficas localizadas en el gen de la

replicasa, A2982G y U3582C. En los experimentos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral se vio que ambos mutantes muestran propiedades fenotípicas similares, aunque U3582C tiende a producir efectos más marcados. La similitud de los efectos fenotípicos de ambas mutaciones puede proporcionar una explicación sobre su prolongada coexistencia como polimorfismos cuando replican en presencia de AZC y también sobre que ambas mutaciones no aparezcan nunca juntas en el mismo genoma. Dado que ambas mutaciones poseen un fuerte coste en *fitness*, si su combinación no confiere ninguna ventaja adicional al virus, el doble mutante será seleccionado en contra (Cabanillas y col. 2013). Ambas sustituciones reducen aproximadamente 2 veces la frecuencia de mutación del virus en presencia de AZC, probablemente debido a una mejor discriminación entre los nucleótidos de pirimidina y sus análogos, aunque en ningún caso alteran el tipo de mutaciones causadas por el AZC. Aunque el efecto que presentan ambas mutaciones en la frecuencia de mutación es pequeño, fue similar al encontrado en otros virus resistentes a mutágenos (Arias y col. 2008), siendo suficiente para evitar la entrada del virus en catástrofe de error. En el caso de la replicación en ausencia de AZC, llevada a cabo en un ensayo realizado a través de pases placa a placa para evitar la pérdida de las mutaciones de resistencia, las frecuencias de mutación de los mutantes no fueron significativamente menores que las del virus salvaje, sugiriendo que las mutaciones A2982G y U3582C no confieren un incremento general en la fidelidad de la replicasa viral, o si lo confieren es demasiado pequeño para ser detectado bajo nuestras condiciones experimentales (Cabanillas y col. 2014).

Las sustituciones A2982G y U3582C producen los cambios de aminoácido T210A e Y410H, respectivamente, los cuales se encuentran localizados en dominios altamente conservados de la subunidad  $\beta$  de la polimerasa (Mills y cols. 1989). Sin embargo, ambas mutaciones se encuentran fuera del sitio catalítico. El aminoácido T210, está menos conservado que Y410, ya que solo se encuentra en Q $\beta$ , SP y MS2, mientras que Y410 está conservado también en el fago GA. La determinación de la estructura cristalina de la replicasa de Q $\beta$  (Takeshita y Tomita 2010, Kidmose y col. 2010) ha permitido determinar la posición exacta de ambos aminoácidos. T210 está localizado en un subdominio estructuralmente conservado del dominio *finger* que contiene elementos de estructura secundaria con una conectividad encontrada en otras RdRp (Kidmose y col. 2010). Diversos estudios llevados a cabo con poliovirus mostraron que la sustitución G64S, responsable de la resistencia a ribavirina en este virus (Arnold y col. 2005), estaba localizada en una región del dominio *finger* de la replicasa viral, similar a la localización de la mutación T210A. Esta región está conectada con el dominio catalítico cuando la polimerasa se encuentra activa, pudiendo explicar que la

fidelidad de las RNA replicasas pueda estar modulada por dominios localizados fuera del sitio catalítico (Gong y Peersen 2010, Korneeva y Cameron 2007). La otra posición analizada, Y410, se encuentra en el dominio *thumb* de la replicasa y establecería puentes de hidrógeno con el grupo fosfato del nucleótido 3' terminal de la cadena de RNA naciente (Takeshita y Tomita 2010). Esta interacción recolocaría el grupo hidroxilo del extremo 3' del nucleósido aceptor dentro del sitio catalítico, permitiendo la reacción de transferencia nucleotídica. Una perturbación en la recolocación de este grupo hidroxilo podría reducir la velocidad de formación del enlace internucleotídico, haciendo que el mutante Q $\beta$ U3582C sea más efectivo para distinguir los nucleósidos correctos de sus análogos mutagénicos como el AZC o el 5-FU. Se ha visto, además, que algunas mutaciones localizadas en posiciones equivalentes de las replicasas de VFA y el virus Coxsackie incrementan levemente la fidelidad de la replicasa (Agudo y col. 2010, Gnädig y col. 2012). Este hecho sugiere que la resistencia al AZC en el bacteriófago Q $\beta$  podría estar mediada por un incremento no específico de la fidelidad de la polimerasa viral. Sin embargo, este incremento debe ser pequeño y para detectarlo sería necesario analizar las frecuencias de mutación en un mayor número de genomas.

#### **6.4 Posible mecanismo de acción de la mutación A1746U en la expresión de la proteína A1**

Cuando el codón de terminación UGA de la proteína de cubierta se lee de forma errónea introduciendo un triptófano, se produce la síntesis de la proteína A1, localizada en la cápsida viral. Este proceso debe estar altamente regulado para asegurar que se expresa el número de copias correcto de cada proteína (ver apartado 2.7.2 de Introducción). Los experimentos de Hung y Overby proporcionaron evidencias de que la proteína de cubierta por sí sola era incapaz de generar partículas infecciosas, mientras que la adición de una fracción conteniendo otra proteína permitía la formación de partículas viables (Hung y Overby, 1969). Experimentos posteriores demostraron que cada una de las proteínas que forman la cápsida viral son completamente necesarias para la formación de nuevas partículas virales infecciosas (Hofstetter y col. 1974), aunque la función concreta de la proteína A1 sigue siendo desconocida (Rumnieks y Tars. 2011).

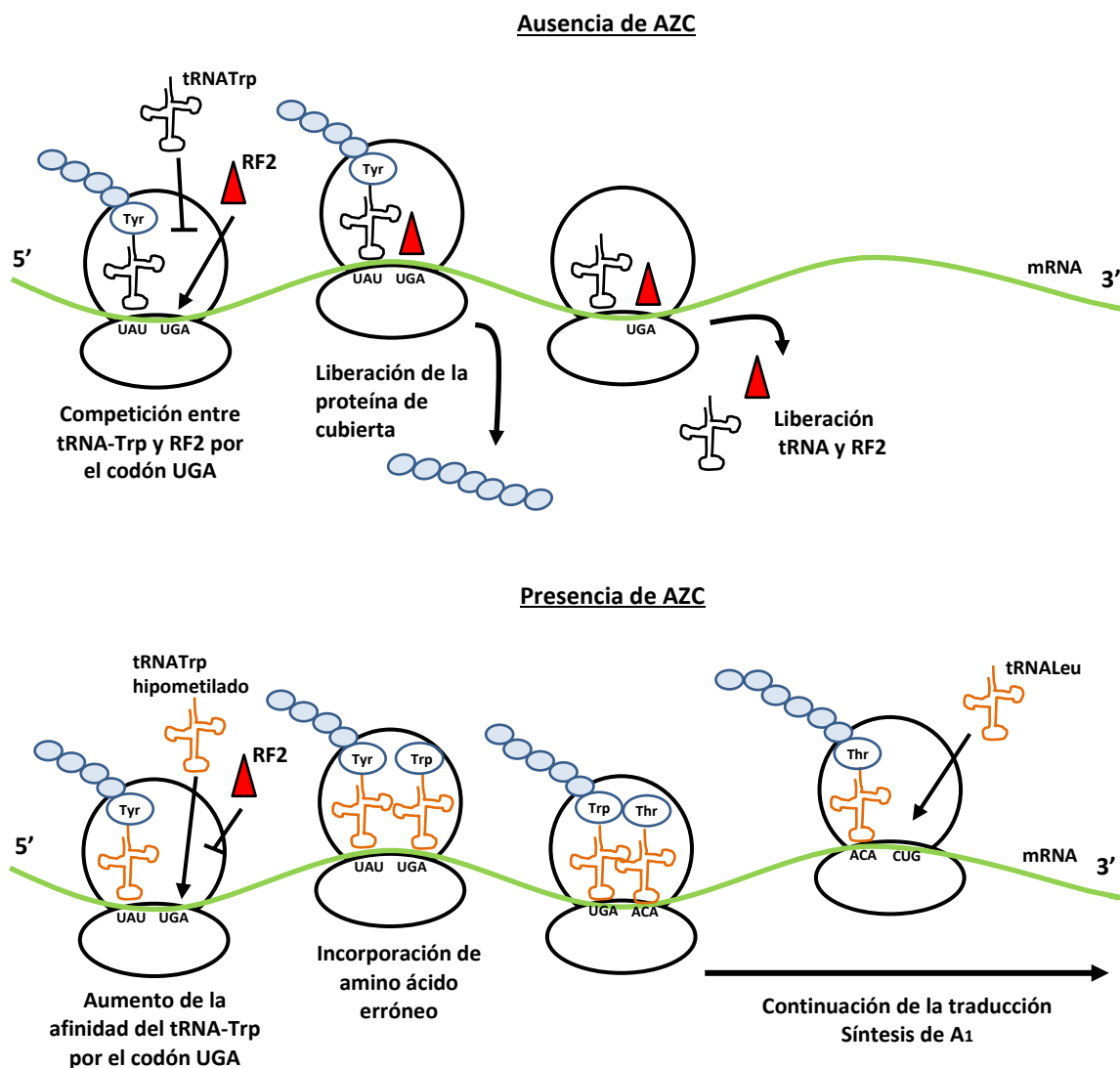
Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran que durante la replicación del bacteriófago Q $\beta$  en presencia de AZC se produce la aparición y fijación de la mutación A1746U que codifica el cambio T134S en la proteína A1. Aunque los valores de *fitness* del mutante Q $\beta$ A1746U son menores que los del virus Q $\beta$ wt tanto en ausencia como en presencia

de AZC, los datos experimentales obtenidos apoyan firmemente la ventaja selectiva de esta mutación en presencia de AZC por las siguientes razones:

- Es la única mutación fijada de forma exclusiva en las poblaciones del bacteriófago Q $\beta$  evolucionadas en presencia de AZC, ya que la fijación de la mutación A2187C también se produce en las poblaciones evolucionadas en ausencia de AZC.
- La competición en presencia de AZC entre el mutante Q $\beta$ A1746U y el virus salvaje Q $\beta$ wt, produce la fijación del nucleótido mutante en tan solo 5 pases.
- Las competencias en presencia de AZC entre el mutante Q $\beta$ A1746U y los mutantes Q $\beta$ A2982G y Q $\beta$ U3582C conducen a la fijación del mutante Q $\beta$ A1746U, desplazando a los otros mutantes en tan solo 5 pases.

Teniendo en cuenta que la proteína A1 es esencial para la correcta formación de las partículas infecciosas (Hofstetter y col. 1974) y que su expresión se encuentra altamente regulada, nos planteamos si es posible que el AZC afecte a la expresión de la proteína A1 y, en tal caso, si la mutación A1746U podría contribuir a disminuir su efecto. El AZC, además de ser un análogo de nucleósido mutagénico, también ejerce un efecto hipometilante sobre los ácidos nucleicos (ver apartado 2.6.1.2 de Introducción). Estudios llevados a cabo en presencia de AZC mostraron la inhibición de las tRNA metil-transferasas, además de una alteración en la metilación y el correcto procesamiento del tRNA (Lee y Karon 1976, Lu y Randerath 1980). Si el tRNA se encuentra hipometilado su procesamiento incorrecto produciría una disminución de la síntesis proteica general. Sin embargo, el efecto hipometilante que ejerce el AZC no siempre va a suponer una disminución en los niveles de síntesis proteicos. Este es el caso de las proteínas *readthrough*, cuya expresión (que depende de la lectura errónea de un codón de terminación de otra proteína) se ve incrementada cuando el estado de metilación del tRNA disminuye. La regulación de la síntesis de este tipo de proteínas está mediada por la afinidad relativa que presentan los factores de liberación de la traducción (RF1 y RF2) y los aminoacil-tRNA por el codón de terminación en cuestión (Bertram y col. 2001). Los tRNA hipometilados compiten de forma más eficiente con los factores RF1 y RF2 (Torabi y Krugliak 2011) por la unión al codón de terminación, resultando en la incorporación errónea de un aminoácido y permitiendo la continuación de la traducción. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral nos hicieron pensar que durante la replicación del bacteriófago Q $\beta$  en presencia de AZC podría producirse la hipometilación del tRNA-Trp (Schaefer y col. 2009), el cual incrementaría su

afinidad por el codón de terminación UGA de la proteína de cubierta, desplazando al factor de liberación de la traducción RF2 y aumentando la expresión de la proteína A1 (**Figura 6.1**).

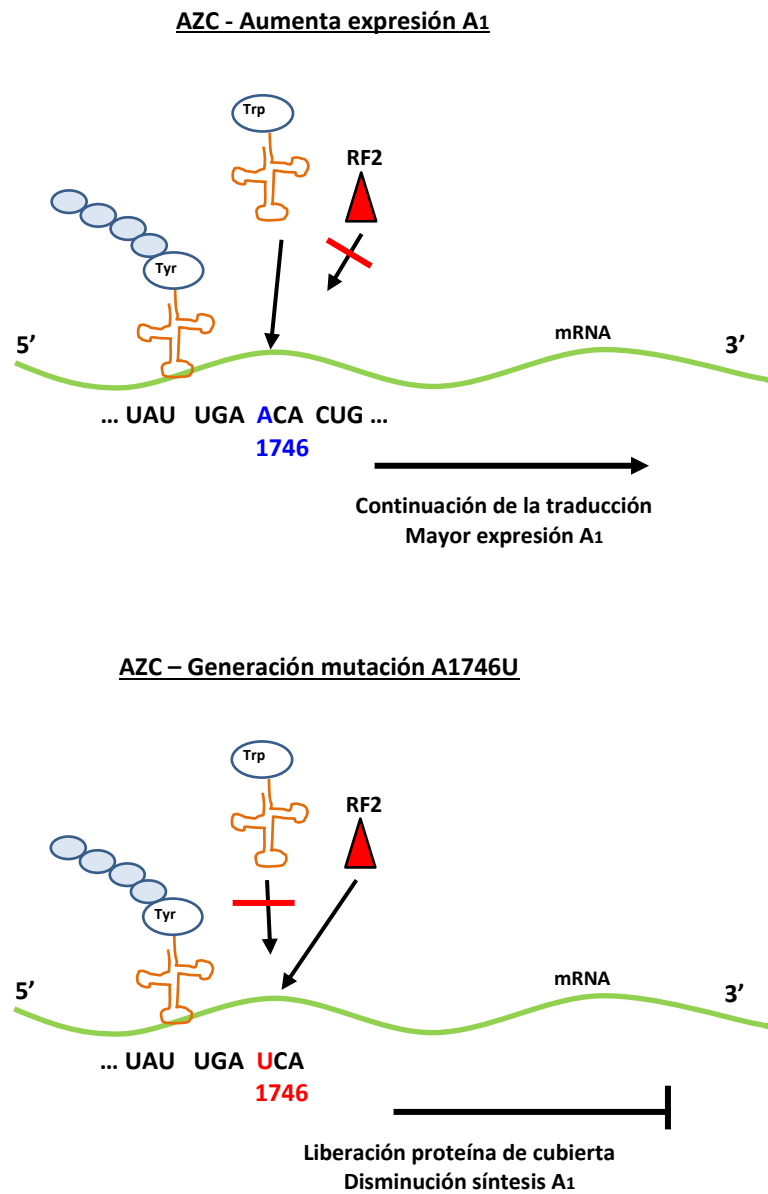


**Figura 6.1. Competición entre el aminoacil-tRNA y el factor RF2 por la unión al codón de terminación UGA de la proteína de cubierta.** En ausencia de AZC (situación normal), se produce una competición por el sitio de unión al codón de terminación UGA entre RF2 y el aminoacil-tRNA. En estas condiciones RF2 presenta mayor afinidad que el tRNA permitiendo que se sinteticen las proporciones adecuadas de las proteínas de cubierta y A1. Por el contrario, en presencia de AZC el tRNA hipometilado aumenta su afinidad por el codón de terminación UGA, lo cual se traduce en un incremento de la expresión de la proteína A1.

Se ha visto que la secuencia de nucleótidos que rodea a los codones de terminación puede afectar a la propia supresión de estos codones (Buckingham y col. 1990) (ver apartado 2.7.2 de Introducción). Estudios llevados a cabo con el virus Sindbis mostraron que el cambio del nucleótido citosina, localizado en la posición inmediatamente posterior al codón de terminación UGA de la proteína nsP3, por cualquiera de los otros 3 nucleótidos (U, A o G), reducía la eficiencia de la expresión de la proteína nsP4 de un 10% a menos del 1% (Li y Rice 1993). Otros estudios llevados a cabo por Engelberg-Kulka sobre la secuencia de nucleótidos situada en la posición adyacente al extremo 3' del codón de terminación UGA del mRNA de varios genes de procariotas, mostraron que la presencia del nucleótido A en esta posición, permitía su supresión *in vivo* por un tRNA-Trp y que los codones UGA no seguidos por un nucleótido A no estaban implicados en la expresión de proteínas *readthrough* (Engelberg-Kulka 1981). Este hecho muestra que dependiendo del tipo de nucleótido que se encuentre localizado en la posición adyacente al extremo 3' del codón de terminación, habrá un porcentaje mayor o menor de continuación de la traducción, afectando a la expresión de las proteínas *readthrough* (Feinstein y Altman 1977, 1978, Fluck y col. 1977, Poole y col. 1995, Salser 1969). La localización de la mutación A1746U en el nucleótido inmediatamente posterior al codón de terminación UGA de la proteína de cubierta nos hizo pensar que este cambio podría afectar a los niveles de expresión de la proteína A1. En ese caso, la ventaja selectiva de la mutación A1746U podría consistir en reducir la afinidad del tRNA-Trp por el codón de terminación UGA, contrarrestándose de este modo el incremento en la síntesis de la proteína A1 que podría producirse debido a la acción hipometilante del AZC (**Figura 6.2**).

Se ha demostrado que los iones magnesio y amonio también presentan efectos hipometilantes sobre los tRNA (Ajitkumar y Cherayil 1986, Leboy 1971). En un estudio llevado a cabo con el bacteriófago Q $\beta$  se vio que la adición de una alta concentración de ion magnesio producía un incremento en la expresión de la proteína A1, mostrando nuevamente que los cambios en los niveles de metilación podían afectar a la correcta lectura del codón de terminación de la proteína de cubierta (Hirashima y col. 1979). Estos resultados nos hicieron pensar que la adición de sales de magnesio o amonio durante la replicación del bacteriófago Q $\beta$  podría producir el mismo efecto que el AZC, y por tanto, también favorecerían la fijación de la mutación A1746U. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la adición de estas sales durante la competición entre el virus salvaje y el mutante Q $\beta$ A1746U, favorece la fijación del nucleótido mutante, mientras que en ausencia de sales se fijaba el nucleótido salvaje, lo cual está de acuerdo con nuestra idea de que la mutación A1746U se selecciona en respuesta al aumento de la síntesis de proteína A1 que tiene lugar en estados de hipometilación.





**Figura 6.2. Regulación de los niveles de expresión de la proteína A1 en presencia de AZC.** Cuando la expresión de la proteína A1 se ve incrementada por la presencia de AZC, se genera una mutación en la posición 1746 que produce el cambio A→U. Este nucleótido disminuiría la afinidad del tRNA-Trp hipometilado por el codón de terminación UGA, liberando la proteína de cubierta en un mayor número de ocasiones y disminuyendo la expresión de la proteína A1.

Otra forma de comprobar que la mutación A1746U se selecciona en presencia de AZC para contrarrestar el incremento de la expresión de la proteína A1, podría ser analizar si posee ventajas selectivas durante la replicación del bacteriófago Q $\beta$  en bacterias supresoras de codones UGA, en las cuáles también es esperable que se produzca un incremento de la síntesis de la proteína A1. Sin embargo, los resultados obtenidos en diversas determinaciones de *fitness*, mostraron que el virus mutante replicado en presencia de AZC presentaba mayor ventaja con respecto al virus salvaje cuando replicaba en bacterias no supresoras que cuando lo hacía en bacterias supresoras (Figura 5.28) (ver apartado 5.6.9 de Resultados). Además, los ensayos de competición realizados entre ambos virus en presencia de bajas concentraciones de AZC mostraron que el virus mutante era desplazado mejor por el salvaje cuando la infección tenía lugar en bacterias supresoras que cuando ocurría en no supresoras. Estos resultados podrían explicarse si los mecanismos por los cuales se modula la interacción de los tRNA supresores y no supresores con codones UGA son diferentes (Kopelowitz y col. 1992), siendo la unión del tRNA no supresor la única que está regulada por el nucleótido adyacente al codón de terminación en posición 3'. Si esto es así, en la cepa supresora se establecería una competición por la unión al codón de terminación UGA entre el tRNA supresor y el no supresor que resultaría en una disminución de la unión del tRNA no supresor hipometilado y, por tanto, en una reducción de la ventaja selectiva de la mutación A1746U.

La fijación de la mutación A1746U produce también otros efectos fenotípicos que han de ser discutidos. Un ensayo de determinación de *fitness* realizado con las poblaciones obtenidas tras la replicación en presencia de AZC de los virus salvaje (Q $\beta$ wt) y mutante (Q $\beta$ A1746U) mostró que en estas condiciones la población obtenida a partir del virus salvaje reducía su *fitness* respecto al virus clonal original, un efecto que no tenía lugar en la población obtenida a partir del mutante (apartado 5.6.8 de Resultados). Este resultado indica que la ventaja selectiva que proporciona la mutación A1746U solo es observable cuando los virus han replicado previamente en presencia de AZC, como ocurre a lo largo de la competición y a lo largo de la propagación del mutante durante varios pases seriados en presencia de AZC, lo cual difiere del efecto mostrado por las mutaciones A2982G y U3582C, localizadas en el gen de la replicasa. Por otro lado, la determinación de la tasa de adsorción a la bacteria hospedadora de ambos virus (Q $\beta$ wt y Q $\beta$ A1746U) y de las poblaciones obtenidas tras su replicación en presencia de AZC (ver apartado 5.6.7 de Resultados) mostró que la incubación previa en presencia de AZC, a pesar de reducir fuertemente la tasa de adsorción, proporciona una clara ventaja al mutante Q $\beta$ A1746U con respecto al virus salvaje. Estos resultados podrían explicarse si en presencia de AZC se produjeran cápsidas virales con mayor contenido en proteína A1 que

reconocen peor el receptor bacteriano. En estas condiciones, el mutante Q $\beta$ A1746U posiblemente restauraría los niveles normales de proteína A1, lo cual conferiría una ventaja a este virus. Sin embargo, en ausencia de AZC, el virus mutante también reduciría los niveles de proteína A1, lo cual parece ser desventajoso para el virus, como se demuestra por su menor *fitness* y tasa de adsorción respecto al virus salvaje. Para confirmar esta idea es necesario realizar un estudio detallado, que nos ayude a entender por qué la adsorción del virus mutante replicado en presencia de AZC resulta más favorable que la del virus salvaje.

Para comprobar finalmente si nuestra explicación para el valor selectivo de la mutación A1746U en presencia de AZC es correcta, nos planteamos en un futuro cuantificar los niveles de expresión de las proteínas de cubierta y A1 tanto para el virus salvaje como para el mutante Q $\beta$ A1746U tras su replicación en presencia y ausencia de AZC. El resultado esperable sería encontrar que el incremento en la expresión de la proteína A1 en presencia de AZC en el virus salvaje sea restaurado en el virus mutante.

## CONCLUSIONES

---

## 7. CONCLUSIONES

1. La evolución del bacteriófago Q $\beta$  en presencia de concentraciones crecientes de AZC conduce a la selección de poblaciones virales que presentan una sensibilidad reducida a este compuesto y que son capaces de mantener su infectividad cuando se alcanzan concentraciones que causan la extinción del virus salvaje.
2. El análisis de las secuencias consenso y los espectros de mutantes de las poblaciones evolucionadas con AZC muestra la fijación de una única mutación y la presencia de numerosos polimorfismos que no llegan a fijarse, a pesar de que algunos de ellos poseen una clara ventaja selectiva en presencia de AZC.
3. En los espectros de mutantes generados a tasa de error incrementada las mutaciones beneficiosas pueden distribuirse en múltiples líneas evolutivas que compiten entre ellas, dificultando la emergencia de una secuencia consenso definida.
4. Las mutaciones localizadas en el gen de la replicasa, A2982G y U3582C, con valor selectivo en presencia de AZC, muestran propiedades fenotípicas similares, aunque la mutación U3582C produce efectos más marcados. Esta similitud, unido al fuerte coste en *fitness* de ambas mutaciones, explicaría su prolongada coexistencia como polimorfismos y que su combinación en el mismo genoma sea letal o altamente deletérea para el virus.
5. El aumento de la resistencia al AZC aportado por las mutaciones A2982G y U3582C está asociado a una disminución de la frecuencia de mutación en los espectros de mutantes, sin alterar el tipo de mutaciones inducido por el AZC. Ambas sustituciones localizadas fuera del sitio catalítico de la polimerasa no producen un incremento general de la fidelidad bajo nuestras condiciones experimentales.
6. La ventaja selectiva que proporciona la mutación A1746U en presencia de AZC solo es observable cuando el mutante ha replicado previamente en presencia de AZC, explicando que, a pesar de que sus valores de *fitness* sean inferiores a los del virus salvaje, el mutante llegue a imponerse en los ensayos de competición.

7. La fijación de la mutación A1746U en el nucleótido inmediatamente posterior al codón de terminación UGA de la proteína de cubierta podría estar implicada en la restauración de los niveles de expresión de la proteína A1 que se verían alterados como consecuencia del efecto hipometilante del AZC sobre los tRNAs.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Agudo, R., Arias, A., and Domingo, E. (2009). 5-fluorouracil in lethal mutagenesis of foot-and-mouth disease virus. *Future Med. Chem.* **1**(3), 529–539.
- Agudo, R., Ferrer-Orta, C., Arias, A. et al. (2010). A multi-step process of viral adaptation to a mutagenic nucleoside analogue by modulation of transition types leads to extinction-escape. *PLoS Pathog.* **6**(8), e1001072.
- Aimiwu, J., Wang H, Chen P, Xie Z, Wang J, Liu S, Klisovic R, Mims A, Blum W, Marcucci G, and Chan KK.(2012). RNA-dependent inhibition of ribonucleotide reductase is a major pathway for 5-azacytidine activity in acute myeloid leukemia. *Blood.* **119**(22):5229-38.
- Airakisen, A., Pariente, N., Menendez-Arias, L., and Domingo, E. (2003). Curing of food-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology* **311**(2), 339-49.
- Ajitkumar, P., and Cherayil, J.D. (1986). Ammonium ions prevent methylation of uridine to ribothymidine in *Azotobacter vinelandii* tRNA. *J. Biosci.* **10**(2), 267-276.
- Arias, A., Isabel de Ávila A., Sanz-Ramos, M., Agudo, R., Escarmís, C., and Domingo, E. (2013). Molecular dissection of a viral quasispecies under mutagenic treatment: positive correlation between fitness loss and mutational load. *J. Gen. Virol.* **94**(4), 817–830.
- Arias, A., Lázaro, E., Escarmís, C., and Domingo, E. (2001). Molecular intermediates of fitness gain of a foot-and-mouth disease virus: Characterization of a mutant spectrum by biological and molecular cloning. *Journal of General Virology*, **82**: 1049-1060.
- Arias, A., Arnold, J.J., Sierra, M., Smidansky, E.D., Domingo, E., and Cameron, C.E. (2008). Determinants of RNA-dependent RNA polymerase (in)fidelity revealed by kinetic analysis of the polymerase encoded by a foot-and-mouth disease virus mutant with reduced sensitivity to ribavirin. *J. Virol.* **82**(24), 12346–12355.
- Arnold, J.J., Vignuzzi, M., Stone, J.K., Andino, R., and Cameron, C.E. (2005). Remote site control of an active site fidelity checkpoint in a viral RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **280**(27), 25706-16.
- Arribas M., Cabanillas L., Lázaro E. (2011). Identification of mutations conferring 5-azacytidine resistance in bacteriophage Q $\beta$ . *Virology* **417**:343-352.
- Axelrod, V.D., Brown, E., Priano, C., and Mills, D.R. (1991). Coliphage Q beta RNA replication: RNA catalytic for single-strand release. *Virology* **184**(2):595-608.
- Barrera, I., Schuppli, D., Sogo, J.M., and Weber, H. (1993). Different mechanisms of recognition of bacteriophage Q $\beta$  plus and minus strand RNAs by Q $\beta$  replicase. *J. Mol. Biol.* **232**,512-521.
- Batschelet, E., Domingo, E., and Weismann, C. (1976). The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. *Gene*, **1**: 27-32.
- Bell, G. (1997). *Selection, the Mechanism of Evolution*. Chapman Hall, New York.
- Bernard, A., Blanco, L., Lazaro, J.M., Martín, G. & Salas, M. (1989).A conserved 3'→5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell* **59**: 219-228.
- Bernhardt, T.G., Wang, I., Struck, D.K., and Young, R. (2001). A protein antibiotic in the phage Q $\beta$  virion: Diversity in lysis targets. *Science* **292**:2326-2329.
- Bernhardt, T.G., Wang, I.N., Struck, D.K., and Young, R. (2002). Breaking free: “protein antibiotics” and phage lysis. *Res. Microbiol.* **153**:493-501.
- Bertram, G., Innes, S., Minella, O., Richardson, J., and Stansfield, I. (2001). Endless possibilities: translation termination and stop codon recognition. *Microbiology* **147**(Pt 2):255-69.



- Betancourt, A.J. (2009). Genomewide patterns of substitution in adaptively evolving population of the RNA bacteriophage MS2. *Genetics* **181**:1535-1544.
- Bhagwat, A.S., and Roberts, R.J. (1987). Genetic analysis of the 5-azacytidine sensitivity of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **169**(4):1537-1546.
- Biebricher, C.K., and Eigen M. (1987). Kinetics of RNA replication by Qbeta Replicase, 1-21. In RNA genetics Vol I: RNA-directed Virus Replication. (1988). Domingo, E., Holland, J.J., and Ahlquist, P. *CRC Press*.
- Biebricher, C.K., and Eigen, M. (2005) The error threshold. *Virus Research* **107**: 117–127.
- Biebricher, C.K., and Eigen, M. (2006) What is a quasispecies? *Current Topics in Microbiology and Immunology* **299**: 1–31.
- Biebricher, C.K., Eigen, M., and Gardiner, W.C. Jr. (1984). Kinetics of RNA replication: plus-minus asymmetry and double-strand formation. *Biochemistry.* **23**(14):3186-94.
- Bonhoeffer, S., Chappey, C., Parkin, N.T., Whitcomb, J.M., Petropoulos, C.J. (2004). Evidence for positive epistasis in HIV-1. *Science* **306**(5701), 1547–1550.
- Bossi, L., and Roth, J. R. (1980). The influence of codon context on genetic code translation. *Nature* **286**:123-127.
- Bradwell, K., Combe, M., Domingo-Calap, P., and Sanjuán, R. (2013). Correlation Between Mutation Rate and Genome Size in Riboviruses: Mutation Rate of Bacteriophage Q $\beta$ . *Genetics* **195**, 243–251.
- Brahmachari, V., and Ramakrishnan, T. (1984). Modified bases in transfer RNA. *J. Biosci.* **6**(5), 757–770.
- Brunet, E., Rouzine, I.M., and Wilke, C.O. (2008). The stochastic edge in adaptive evolution. *Genetics*, **179**:603-620.
- Buckheit Jr, R.W. (2004). Understanding HIV resistance, fitness, replication capacity and compensation: targeting viral fitness as a therapeutic strategy. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **13**(8), 933–958.
- Buckingham, R.H., Sørensen, P., Pagel, F.T., Hijazi, K.A., Mims, B.H., Brechemier-Baey, D., and Murgola, E.J. (1990). Third position base changes in codons 5' and 3' adjacent UGA codons affect UGA suppression in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **1050**(1-3):259-62.
- Bull, J.J., Sanjuán, R., and Wilke, C.O. (2007). Theory of lethal mutagenesis for viruses. *J. Virol.* **81**(6), 2930–2939.
- Burch, C.L., and Chao, L. (2004). Epistasis and its relationship to canalization in the RNA virus phi 6. *Genetics* **167**(2), 559–567.
- Cabanillas L., Arribas M., and Lázaro E. (2013). Evolution at increased error rate leads to the coexistence of multiple adaptive pathways in an RNA virus. *BMC Evol. Biol.* **13**:11.
- Cabanillas L., Sanjuán R., and Lázaro E. (2014). Changes in protein domains outside the catalytic site of the bacteriophage Q $\beta$  replicase reduce the mutagenic effect of 5-azacytidine. *J. Virol.* **88**:10480-10487.
- Capecchi, M.R. (1967). Polypeptide chain termination in vitro: isolation of a release factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **58**(3):1144-51.
- Carrasco, P., de la Iglesia, F., and Elena, S.F. (2007). Distribution of fitness and virulence effects caused by single-nucleotide substitutions in Tobacco Etch virus. *J. Virol.* **81**(23):12979-84.
- Carrico, C.K., & Glazer, R.I. (1979). Effect of 5-fluorouracil on the synthesis and translation of polyadenylic acid-containing RNA from regeneration rat liver. *Cancer Res.* **39**, 3694-701.
- Cases-González C., Arribas M., Domino E., and Lázaro E. (2008). Beneficial effects of population bottlenecks in an RNA virus evolving at increased error rate. *J. Mol. Biol.* **384**:1120-1129.
- Chan, T.S., and Garen, A. (1970). Amino acid substitutions resulting from suppression of nonsense mutations. V. Tryptophan insertion by the Su9 gene, a suppressor of the UGA nonsense triplet. *J. Mol. Biol.* **49**(1):231-4.
- Churchill, G.A. (2001). Epistasis. p638. Academic Press.

- Christman, J.K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* **21**, 5483-5495.
- Christman, J.K., Mendelsohn, N., Herzog, D., and Schneiderman, N. (1983). Effect of 5-azacytidine on differentiation and DNA methylation in human promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Cancer Res.* **43(2)**:763-9.
- Cihak, A. (1974). Biological Effects of 5-azacytidine in Eukaryotes. *Oncology* **30**:405-422.
- Cihak, A., and Sorm, F. (1965). Biochemical effects and metabolic transformations of 5-azacytidine in *Escherichia coli*. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **30**:2091-2102.
- Cihak, A., and Vesely, J. (1973). Enhanced uridine kinase in rat liver following 5-azacytidine administration. In vivo characterization and properties of partially purified enzyme. *J. Biol. Chem.* **248(4)**:1307-13.
- Clarke, D.K., Duarte, E.A., Moya, A., Elena, S.F., Domingo, E., and Holland, J.J. (1993). Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses. *J. Virol.* **67(1)**, 222-228.
- Coffey, L.L., Beeharry, Y., Bordería, A.V., Blanc, H., and Vignuzzi, M. (2011). Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108(38)**, 16038–16043.
- Colby, D. S., P. Schedi, and C. Guthrie. 1976. A functional requirement for modification of the wobble nucleotide in the anticodon of a T4 suppressor tRNA. *Cell* **9**:449-463.
- Creusot, F., Acs, G., and Christman, J.K. (1982). Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J. Biol. Chem.* **257(4)**:2041-8.
- Crotty, S., Cameron, C.E., and Andino, R. (2001). RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98(12)**, 6895–6900.
- Crotty, S., Cameron, C., and Andino, R. (2002). Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *J. Mol. Med.* **80(2)**, 86-9.
- Crotty, S., Maag, D., Arnold, J.J., Zhong, W., Lau, J.Y., Hong, Z., Andino, R., and Cameron, C.E. (2000). The broad-spectrum antiviral ribonucleotide, ribavirin, is an RNA virus mutagen. *Nature Medicine* **6**, 1375-1379.
- Cuevas, J.M., Duffy, S., and Sanjuán, R. (2009). Point mutation rate of bacteriophage  $\Phi$ X174. *Genetics* **183**:747-749.
- Cuevas, J.M., Sanjuán, R. and Moya, A. (2009). Evolución experimental en virus. In: Adaptación y evolución. 150 años después del Origen de las Especies. *SESBE*
- Cummings, K.J., Lee, S.M., West, E.S., Cid-Ruzafa, J., Fein, S.G., Aoki, Y., Sulkowski, M.S., and Goodman, S.N. (2001). Interferon and ribavirin vs interferon alone in the treatment of chronic hepatitis C previously nonresponsive to interferon: A meta-analysis of randomized trials. *Jama* **285**:193-9.
- Dapp, M.J., Clouser, C.L., Patterson, S., and Mansky, L.M. (2009). 5-Azacytidine can induce lethal mutagenesis in human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **83(22)**, 11950–11958.
- Davis, G.L., Esteban-Mur, R., Rustgi, V., Hoefs, J., Gordon, S.C., Trepo, C., Shiffman, M.L., Zeuzem, S., Craxi, A., Ling, M.H., and Albrecht, J. (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1493-9.
- Day, C.W., Smeeth, D.F., Julander, J.G., Yamshchikov, V.F., Sidwell, R.W., and Morrey, J.D. (2005). Error-prone replication of West Nile virus caused by ribavirin. *Antiviral Res.* **67(1)**:35-45.
- De Cabo, S.F., Hazen, M.J., Molero, M.L., and Fernández-Piqueras, J. (1994). S-adenosyl-L-homocysteine: a non-cytotoxic hypomethylating agent. *Experientia* **50(7)**:658-9.

- Desay, M. and Fisher, D.S. (2007). Beneficial mutation-selection balance and the effect of linkage on positive selection. *Genetics* **176**:1759-1798.
- Desay, M., Fisher, D.S. and Murray, A.W. (2007). The speed of evolution and maintenance of variation in asexual populations. *Curr. Biol.* **17**:385-394.
- d'Herelle, F. (1917). An invisible microbe that is antagonistic to the dysentery bacillus. *Comptes rendus Acad. Sciences*, **165**: 373-375.
- de Visser, J.A., Cooper, T.F., and Elena, S.F. (2011). The causes of epistasis. *Proc. R. Soc. B.* **278**, 3617–3624.
- Dinçbas-Renqvist, V., Engström, A., Mora, L., Heurgué-Hamard, V., Buckingham, R., and Ehrenberg, M. (2000). A post-translational modification in the GGQ motif of RF2 from *Escherichia coli* stimulates termination of translation. *EMBO J.* **19**(24):6900-7.
- Domingo, E. (1994). Virus en Evolución. Una aproximación a la dinámica poblacional de los virus y al origen de nuevas enfermedades víricas. *Eudema*, S.A.
- Domingo, E. (2007). Virus Evolution, en *Fields I*, Vol. **12**, eds. 5<sup>th</sup> edn, pp 389-421. (Ed. Knipe, D.M. & Howley, P.M.) *Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins*.
- Domingo E., and Holland J.J. (1994). Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In "Evolutionary Biology of Viruses" (S.S. Morse, Ed.), pp 161-184. *Raven Press*, New York.
- Domingo E., and Holland J.J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 151-178.
- Domingo, E., Holland, J.J., and Ahlquist, P. (1988). RNA Genetics. *Boca Ratón: CRC Press*.
- Domingo, E., Biebricher, C., Eigen, M., and Holland, J.J. (2001). Quasispecies and RNA Virus Evolution: Principles and Consequences. *Landes Bioscience*, Austin.
- Domingo, E., Escarmís, C., Sevilla, N., Moya, A., Elena, S. F., Quer, J., et al. (1996). Basic Concepts in RNA virus evolution. *The FASEB Journal*, 859-864.
- Domingo, E., Escarmís, C., Menéndez-Arias, L., and Holland, J.J. (1999). Viral Quasispecies and Fitness Variations en Origin and Evolution of Viruses (Ed. Domingo, E., Parrish, C.R., and Holland, J.J.) *Academic Press*.
- Domingo, E., Escarmis, C., Menéndez-Arias, L., Perales, C., Herrera, M., Novella, I., and Holland, J.J (2008). Viral quasispecies: dynamics, interactions and pathogenesis, In: Domingo, E., Parrish, C., Holland, J.J., et al. (Eds.), Origin and Evolution of viruses, 2nd edition. *Elsevier, Amsterdam* (The Netherlands), pp. 87–118.
- Domingo, E., Martin, V., Perales, C., Grande-Perez, A., Garcia-Arriaza, J., and Arias, A. (2006). Viruses as Quasispecies: Biological implications. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg CTMI* **299**:51–82.
- Domingo, E., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J.C., Portela, A., Ortín, J., López-Galindez, C., Pérez-Breña, P., Villanueva, N., Nájera, R., et al. (1985). The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. *Gene* **40**(1):1-8.
- Domingo, E., Menéndez-Arias, L., Quiñones-Mateu, M.E., Holguín, A., Gutiérrez-Rivas, M., Martínez, M.A., Quer, J., Novella, I.S., and Holland, J.J. (1997). Viral quasispecies and the problem of vaccine-escape and drug-resistant mutants. *Prog. Drug. Res.* **48**, 99-128.
- Domingo, E., Ruiz- Jarabo, C.M., Arias, A., Molina-Paris, C., Briones, C., Baranowski, E., and Escarmis, C. (2003). Detection and biological implications of genetic memory in viral quasispecies. In *Cardiomyopathies and Heart Failure: Biomolecular, Infectious and Immune Mechanisms* (A. Matsumori, Ed.), pp. 259-276. *Kluwer Academic Publishers*, London, UK.
- Domingo E., Sabo D.L., Taniguchi T., and Weissmann C. (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* **13**:735–44.
- Domingo, E., Sheldon, J., and Perales, C. (2012). Viral quasispecies evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**(2):159-216.

- Doskocil, J., and Sorm, F. (1967). The action of 5-azacytidine on bacteria infected with bacteriophage T4. *Biochim. Biophys. Acta* **145**:780-791.
- Doskocil, J., and Sorm, F. (1969). Incorporation and Phosphorylation of 5 -Azacytidine by Normal and T4-Phage-Infected Cells of *E. coli*. *European J. Biochem.* **8**:75-80.
- Doskocil, J., and Sorm, F. (1970). The effects of 5-azacytidine and 5-azauridine on protein synthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38(4)**:569-574.
- Doskocil, J., Paces, V., and Sorm, F. (1967). Inhibition of protein synthesis by 5-azacytidine in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **145**:771-779.
- Draghi, J.A., Parsons, T.L., Wagner, G.P., and Plotkin, J.B. (2010). Mutational robustness can facilitate adaptation. *Nature*. **463**:353-355.
- Dragun, M., Rada, B., Novotny, L., and Beranek, J. (1990). Antiviral activities of pyrimidine nucleoside analogues: some structure-activity relationships. *Acta Virol.* **34**, 321-9.
- Drake, J.W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA- based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7160-7164.
- Drake, J.W. (1999). The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes, and eukaryotes. *Ann. NY Acad. Sci.* **870**, 100–107.
- Drake J.W., Charlesworth B., Charlesworth D., and Crow J.F. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics* **148**:1667–86.
- Drake J.W., and Holland J.J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc Nat Acad Sci USA* **96**:13910–3.
- Echols, H. & Goodman, M.F. (1991). Fidelity mechanism in DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* **60**: 477-511.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**:457-463.
- Eigen, M. (1971). Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**: 465–523.
- Eigen, M. (1993). Viral quasispecies. *Sci. Am.* **269**(1), 42-9.
- Eigen, M. (2002). Error catastrophe and antiviral strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**: 13374–13376.
- Eigen, M., and Biebricher CK. (1988). Sequence space and quasispecies distribution. In: Domingo E., Holland J.J., Ahlquist P., editors. RNA genetics: Variability of RNA genomes, vol III. 1st ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 1988. p. 211–45.
- Eigen, M., and Schuster P. (1979). The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle. *Naturwissenschaften* **64**:541–65.
- Elena, SF. (1999). Little evidence for synergism among deleterious mutations in a nonsegmented RNA virus. *J. Mol. Evol.* **49(5)**, 703–707.
- Elena, SF. (2012). RNA virus genetic robustness: possible causes and some consequences. *Curr. Opin. Virol.* **2(5)**, 525–530.
- Elena, SF., and Lenski, R.E. (2003). Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat. Rev. Genet.* **4**, pp. 457-469.
- Engelberg-Kulka, H. (1981). UGA suppression by normal tRNA<sup>Trp</sup> in *Escherichia coli*: codon context effects. *Nucleic Acids Research* **9(4)**: 983-991.
- Escarmís, C., Carrillo, E.C., Ferrer, M., Arriaza, J.F., López, N., Tami, C., Verdaguer, N., Domingo, E., and Franze-Fernández, M.T. (1998). Rapid selection in modified BHK-21 cells of a foot-and-mouth disease virus variant showing alterations in cell tropism. *J. Virol.* **72**, 10171-10179.
- Escarmís, C., Dávila, M., and Domingo, E. (1999). Multiple Molecular Pathways for Fitness Recovery of an RNA Virus Debilitated by Operation of Muller's Ratchet. *Journal of Molecular Biology* , 285: 495-505.
- Escarmís, C., Lázaro, E., and Manrubia, SC. (2006). Population bottlenecks in quasispecies dynamics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **299**, 141–170.

- Escarmís, C., Lázaro, E., Arias, A., and Domingo, E. (2008). Repeated bottleneck transfers can lead to non-cytocidal forms of a cytopathic virus: implications for viral extinction. *J Mol Biol.* **15**;376(2):367-79.
- Eyre-Walker, A., and Keightley, P.D. (2007). The distribution of fitness effects of new mutations. *Nat. Rev. Genet.* **8**:610-618.
- Feinstein, S. I., and Altman, S. (1977). Coding properties of an ochre-suppressing derivative of *Escherichia coli* tRNA<sup>I<sup>tyr</sup></sup>. *J. Mol. Biol.* **112**(3):453-70.
- Feinstein, S. I., and Altman, S. (1978). Context effects on non-sense codon suppression in *Eschenchia coli*. *Genetics* **88**:201-219.
- Fernández-Larsson, R., O'Connell, K., Koumans, E., and Patterson, J.L. (1989). Molecular analysis of the inhibitory effect of phosphorylated ribavirin on the vesicular stomatitis virus in vitro polymerase reaction. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **33**(10):1668-73.
- Ferrer-Orta C, Arias A, Escarmís C, and Verdaguer N. (2006). A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**(1):27-34.
- Firth, A.E., Wills, N.M., Gesteland, R.F., and Atkins, J.F. (2011). Stimulation of stop codon readthrough: frequent presence of an extended 3' RNA structural element. *Nucleic Acids Res.* **39**(15):6679-91.
- Fisher, R.A. (1918) The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Trans. R. Soc. Edin.*, **52**, 399–433.
- Fluck, M. M., Salser, W., and Epstein, R. H. (1977). The influence of the reading context upon the suppression of nonsense codons. *Mol. Gen. Genet.* **151**:137-149.
- Friedberg, E.C., Walker, G.D., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., and Ellenberger, T. (2006). "DNA repair and mutagenesis". *American Society for Microbiology*, Washington DC.
- Friedman, S. (1981). The inhibition of DNA (cytosine-5)methylases by 5-azacytidine: the effect of azacytosine-containing DNA. *Mol. Pharmacol.* **19**:314-320.
- Friedman, S. (1982). Bactericidal effect of 5-azacytidine on *Escherichia coli* carrying EcoRII restriction-modification enzymes. *J. Bacteriol.* **151**(1):262-268.
- Furió, V., Moya, A., and Sanjuán, R. (2005). The cost of replication fidelity in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**(29), 10233–10237.
- Furió, V., Moya, A., and Sanjuán, R. (2007). The cost of replication fidelity in human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Biol. Sci.* **274**(1607), 225–230.
- Gallois-Montbrun, S., Chen, Y., Dutartre, H., Sophys, M., Morera, S., Guerreiro, C., Schneider, B., Mulard, L., Janin, J., Veron, M., Deville-Bonne, D., and Canard, B. (2003). Structural analysis of the activation of ribavirin analogs by NDP kinase: comparison with other ribavirin targets. *Mol. Pharmacol.* **63**, 538-46.
- García-Villada, L., and Drake, J.W. (2013). Experimental selection reveals a trade-off between fecundity and lifespan in the coliphage Qβ. *Open Biol.* **3**: 130043.
- Geller, A.L., and Rich, A. (1980). A UGA termination suppression tRNA<sup>Trp</sup> active in rabbit reticulocytes. *Nature.* **283**(5742):41-6.
- Gerrish, P.J., and Lenski, R.E. (1998). The fate of competing beneficial mutations in an asexual population. *Genetica* **102/103**: 127–144.
- Ghosal, K., & Jacob, S.T. (1994). Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. *Cancer Res.* **54**: 632-6.
- Ghosal, K., & Jacob, S.T. (1997). An alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil, a potent anticancer drug. *Biochem. Pharmacol.* **53**:1569-75.
- Glazer, R.I., Peale, A.L., Beisler, J.A., and Abbasi, M.M. (1980). The effect of 5-azacytidine and dihydro-5-azacytidine on nuclear ribosomal RNA and poly(A) RNA synthesis in L1210 cells in vitro. *Mol. Pharmacol.* **17**(1):111-7.
- Glick, J.M., Ross, S., and Leboy, P.S. (1975). S-adenosylhomocysteine inhibition of three purified tRNA methyltransferases from rat liver. *Nucleic Acids Res.* **2**(10):1639-51.

- Gnädig, N.F., Beaucourt, S., Campagnola, G., Bordería, A.V., Sanz-Ramos, M., Gong, P., Blanc, H., Peersen, O.B., and Vignuzzi, M. (2012). Coxsackievirus B3 mutator strains are attenuated in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**(34):E2294-303.
- Gong, P., and Peersen, O.B. (2010). Structural basis for active site closure by the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**(52):22505-10.
- González-López, C., Arias, A., Pariente, N., Gómez-Mariano, M., and Domingo, E. (2004). Preextinction viral RNA can interfere with infectivity. *J. Virol.* **78**, 3319-24.
- Gordon, M.P., & Staehelin, M. (1959). Studies on the incorporation of 5-fluorouracil into a virus nucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **36**, 351-61.
- Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. (2010). SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Mol. Biol. Evol.* **27**(2):221–224.
- Graci, J.D., Too, K., Smidansky, E.D., Edathil, J.P., Barr, E.W., Harki, D.A., Galarraga, J.E., Bollinger, J.M. Jr., Peterson, B.R., Loakes, D., Brown, D.M., and Cameron, C.E. (2008). Lethal mutagenesis of picornaviruses with N-6-modified purine nucleoside analogues. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**(3):971-9.
- Grande-Pérez, A., Sierra, S., Castro, M.G., Domingo, E., and Lowenstein, P.R. (2002). Molecular indetermination in the transition to error catastrophe: systematic elimination of lymphocytic choriomeningitis virus through mutagenesis does not correlate linearly with large increases in mutant spectrum complexity. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(20):12938-43.
- Grande-Pérez, A., Lázaro, E., Lowenstein, P., Domingo, E., and Manrubia, S.C. (2005). Suppression of viral infectivity through lethal defection. *PNAS* **102**(12), 4448–4452.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **59**(3):307–321.
- Hagemann, S., Heil, O., Lyko, F., and Brueckner, B. (2011). Azacytidine and Decitabine induce Gene-Specific and Non-Random DNA Demethylation in Human Cancer Cell lines. *PLoS ONE* **6**(3): e17388.
- Halle, S. (1968). 5-Azacytidine as a mutagen for arboviruses. *J. Virol*, **2**: 1228-1229.
- Hanka, L.J., Evans, J.S., Mason, D.J. and Dietz, A. (1966). Microbiological production of 5-azacytidine. I. Production and biological activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **6**:619-624.
- Hatfield, D. (1985). Suppression of termination codons in higher eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **10**:201-204.
- Hegreness, M., Shores, N., Hartl, D., and Kishony, R. (2006). An equivalence principle for the incorporation of favourable mutations in asexual populations. *Science*, **17**(311):1615-1617.
- Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., Danneber, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R.J., Plevin, E., and Scheiner, J. (1957). Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor-inhibitory compounds. *Nature* **179**:663-6.
- Heineman, R.H., and Bull, J.J. (2007). Testing optimality with experimental evolution: lysis time in a bacteriophage. *Evolution* **61**:1695–1709.
- Hirashima, A., Harigai, H., and Watanabe, I. (1979). Enhancing effect of magnesium ion on cell-free synthesis of read-through protein of bacteriophage Qbeta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **88**(3):1046-51.
- Hmwe, S.S., Aizaki, H., Date, T., Murakami, K., Ishii, K., Miyamura, T., Koike, K., Wakita, T., and Suzuki, T. (2010). Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res.* **85**(3):520-4.
- Hofstetter, H., Monstein, H.J., and Weissmann, C. (1974). The read-through protein A1 is essential for the formation of viable Q $\beta$  particles. *Biochim. Biophys. Acta* **374**:238-251.

- Holder, K.K., and Bull, J.J. (2001). Profiles of adaptation in two similar viruses. *Genetics* **159**(4):1393-404.
- Holmes, E.C. (2003). Error thresholds and the constraints to RNA virus evolution. *Trends Microbiol.* **11**(12), 543–546
- Holland, J.J. (1993). Replication error, quasispecies populations, and extreme evolution rates of RNA viruses. In *Emerging Viruses*, ed. SS Morse, pp. 203–18. Oxford: Oxford Univ. Press
- Holland, J.J., Domingo, E., de la Torre, J.C., and Steinhauer, D.A. (1990). Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J. Virol.* **64**(8), 3960–3962.
- Holland, J.J., de la Torre, J.C., and Steinhauer, D. (1992). RNA virus populations as quasispecies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **176**:1–20.
- Hung, P.P., and Overby, L.R. (1969). The reconstitution of infective bacteriophage Q beta. *Biochemistry* **8**(3):820-8.
- Iranzo, J., Perales, C., Domingo, E., and Manrubia, S.C. (2011). Tempo and mode of inhibitor-mutagen antiviral therapies: a multidisciplinary approach. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**(38), 16008–16013.
- Jones, P.A. (1984). Gene activation by 5-azacytidine, p. 165-187. In A. Razin, H. Cedar, and A. D. Riggs (ed.), DNA methylation: biochemistry and biological significance. *Springer-Verlag, New York*.
- Jones, P.A. (1985). Effects of 5-azacytidine and its 2'-deoxyderivative on cell differentiation and DNA methylation. *Pharmacol. Ther.* **28**:17-27.
- Jones, P.A., and Taylor, S.M. (1980). Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* **20**(1):85-93.
- Karnik, S., and Billeter, M. (1983). The lysis function of RNA bacteriophage Q $\beta$  is mediated by the maturation (A2) protein. *EMBO J.* **2**(9):1521-6.
- Karon, M., and Benedict, W.F. (1970). Arabinosylcytosine-induced chromosome breakage and the cell cycle. *Clin. Res.* **18**,219.
- Karon, M., and Benedict, W.F. (1972). Chromatid breakage: differential effect of inhibitors of DNA synthesis during G2 phase. *Science* **178**(4056):62.
- Kidmose, R.T., Vasiliev, N.N., Chetverin, AB., Andersen, GR., and Knudsen, CR. (2010). Structure of the Q $\beta$  replicase, an RNA-dependent RNA polymerase consisting of viral and host proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**(24):10884-9.
- Kohli, J., and Grosjean, H. (1981). Usage of the three termination codons: compilation and analysis of the known eukaryotic and prokaryotic translation termination sequences. *Mol. Gen. Genet.* **182**(3):430-9.
- Kopelowitz, J., Hampe, C., Goldman, R., Reches, M. and Engelberg-Kulka, H.(1992). Influence of Codon Context on UGA Suppression and Readthrough. *J. Mol. Biol.* **225**, 26-269.
- Korneeva, V.S., and Cameron, C.E. (2007). Structure-function relationships of the viral RNA-dependent RNA polymerase: fidelity, replication speed, and initiation mechanism determined by a residue in the ribose-binding pocket. *J. Biol. Chem.* **282**(22):16135-45.
- Kunkel, T.A. & Alexander, P.S. (1986). The base substitution fidelity of eukaryotic DNA polymerases. Mismatching frequencies, site preferences, insertion preferences, and base substitution by dislocation. *Journal of Biological Chemistry*, **261**: 160-166.
- Lal, D., Som, S., and Friedman, S. (1988). Survival and mutagenic effects of 5-azacytidine in *Escherichia coli*. *Mutation Research*, **193**:229-236.
- Lalić, J., and Elena, SF. (2012). Magnitude and sign epistasis among deleterious mutations in a positive-sense plant RNA virus. *Heredity* **109**(2), 71–77.
- Landford, R.E., Chavez, D., Guerra, B., Lau, J.Y., Hong, Z., Brasky, K.M., and Beames, B. (2001). Ribavirin induces error-prone replication of GB virus B in primary tamarin hepatocytes. *J.Virol.* **75**, 8074-81.

- Landolph, J.R., and Jones, P.A. (1982). Mutagenicity of 5-azacytidine and related nucleosides in C3H/10T 1/2 clone 8 and V79 cells. *Cancer Res.* **42**(3):817-23.
- Lauring A.S. and Andino R. (2010). Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathogens* **6**: e1001005.
- Lauring, A.S., Frydman, J., and Andino, R. (2013). The role of mutational robustness in RNA virus evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**(5), 327–336.
- Lázaro, E. (2014). RNA virus evolution at variable error rate. *Future Virol.* **9**(7), 665-677.
- Lázaro, E., Escarmís, C., Pérez-Mercader, J., Manrubia, S.C. & Domingo, E. (2003). Resistance of virus to extinction on bottleneck passages: study of a decaying and fluctuating pattern of fitness loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**: 10830-10835.
- Leboy, P.S. (1971). Influence of polyamines and salts on changing patterns of tRNA methylation. *FEBS Lett.* **16**(2):117-120.
- Lee, C.H., Gilbertson, D.L., Novella, I.S., Huerta, R., Domingo, E., and Holland, J.J. (1997). Negative effects of chemical mutagenesis on the adaptive behavior of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **71**(5), 3636–3640.
- Lee, T.T., and Karon, M.R. (1976). Inhibition of protein synthesis in 5-azacytidine-treated HeLa cells. *Biochem. Pharmacol.* **25**(15):1737-42.
- Lemon, S.M. (1997a). Targering the Achilles' heel of hepatitis C virus. *Hepatology* **25**(4), 1035-7.
- Lemon, S.M. (1997b). Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. *Clin. Chem.* **43**(8 Pt 2), 1494-9.
- Lenz, H.J., Manno, D.J., Danenberg, K.D., & Danenberg, P.V. (1994). Incorporation of 5-fluorouracil into U2 and U6 snRNA inhibits mRNA precursor splicing. *J. Biol. Chem.* **269**,31962-8.
- Levi, L.I., Gnädig, N.F., Beaucourt, S. et al. (2010). Fidelity variants of RNA dependent RNA polymerases uncover an indirect, mutagenic activity of amiloride compounds. *PLoS Pathog.* **6**(10), e1001163.
- Li, L.H., Olin, E.J., Buskirk, H.H., and Reineke, L.M. (1970). Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia. *Cancer Res.* **30**(11):2760-9.
- Li, G., and Race, C.M. (1993). The Signal for Translational Readthrough of a UGA Codon in Sindbis Virus RNA Involves a Single Cytidine Residue Immediately Downstream of the Termination Codon. *J. Virol.* **67**(8): 5062-5067.
- Loeb, L.A., Essigmann, J.M., Kazazi, F., Zhang, J., Rose, K.D., and Mullins, J.I. (1999). Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**(4), 1492–1497.
- Loeb, L.A., and Mullins, J.I. (2000). Lethal mutagenesis of HIV by mutagenic ribonucleoside analogs. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**(1), 1–3.
- Loeb, T., and Zinder, N.D. (1961). A bacteriophage containing RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**:282-9.
- Lu, L-J.W., and Randerath, K. (1979). Effects of 5-azacytidine on transfer RNA methyltransferases. *Cancer Res.* **39**(3):940-9.
- Lu, L-J.W., and Randerath, K. (1980). Mechanism of 5-Azacytidine-induced Transfer RNA Cytosine-5-methyltransferase Deficiency. *Cancer Research* **40**:2701-2705.
- Maag, D., Castro, C., Hong, Z., and Cameron, C.E. (2001). Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J. Biol. Chem.* **276**(4):46094-8.
- Maisnier-Patin, S., and Andersson, D.I. (2004). Adaptation to the deleterious effects of antimicrobial drug resistance mutations by compensatory evolution. *Res. Microbiol.* **155**(5), 360–369.
- Mangia, A., Santoro, R., Minerva, N., Ricci, G.L., Carretta, V., Persico, M., Vinelli, F., Scotto, G., Bacca, D., Annese, M., Romano, M., Zechini, F., Sogari, F., Spirito, F., and Andriulli, A.



- (2005). Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2609-17.
- Manrubia SC., and Lázaro E. (2006). Viral evolution. *Physics of Life Reviews* **3**: 65–92.
- Manrubia, SC., Escarmís, C., Domingo, E., and Lázaro, E. (2005). High mutation rates, bottlenecks, and robustness of RNA viral quasispecies. *Gene* **347(2)**, 273–282.
- Martínez, M.A., Carrillo, C., González-Candelas, F., Moya, A., Domingo, E., and Sobrino, F. (1991). Fitness alteration of food-and-mouth disease virus mutants: measurement of adaptability of viral quasispecies. *J. Virol.* **65(7)**, 3954-3957.
- Mikkelsen, J.G., and Pedersen, F.S. (2000). Genetic reassortment and patch repair by recombination in retroviruses. *J. Biomed. Sci.* **7(2)**, 77-99.
- Mills, D.R., Priano, C., DiMauro, P. & Binderow, B.D. (1988). Q $\beta$  replicase: Mapping the functional domains of an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **205**, 751–764.
- Mills, D.R., Priano, C., DiMaduro, P., & Binderow, B.D. (1989). Q $\beta$ replicase: mapping the functional domains of an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **205**, 751-764.
- Mills, D.R., Priano, C., Merz, P., and Binderow B.D. (1990). Q $\beta$  RNA bacteriophage: mapping cis-acting elements within an RNA genome. *J. Virol.* **64**, 3872-3881.
- Miralles, R., Gerrish, P.J., Moya, A., and Elena, S.F. (1999). Clonal interference and the evolution of RNA viruses. *Science* **285(5434)**:1745-7.
- Montville, R., Froissart, R., Remold, S.K., Tenaillon, O., and Turner, P.E. (2005). Evolution of mutational robustness in an RNA virus. *PLoS Biol* **3(11)**: e381.
- Mora, L., Heurgué-Hamard, V., de Zamaroczy, M., Kervestin, S., and Buckingham, R.H. (2007). Methylation of bacterial release factors RF1 and RF2 is required for normal translation termination in vivo. *J. Biol. Chem.* **282(49)**:35638-45.
- Motorin, Y., and Helm, M. (2011). RNA nucleotide methylation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. **2(5)**:611-31.
- Moya, A., Holmes, E.C., and González-Candelas, F. (2004). The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nat Rev Microbiol* **2**:279–88.
- Murphy, FA. (1996). Virus taxonomy. In *Fields Virology*, ed. BN Fields, DM Knipe, PM Howley, RM Chanock, JL Melnick, et al, pp. 15–57. *Philadelphia: Lippincott-Raven*.
- Müller, H.J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutat Res*, 106: 2-9.
- Muller, W.E., Maidhof, A., Taschner, H., and Zhan, R.K. (1977). Virazole (1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) a cytostatic agent. *Biochem. Pharmacol.* **26**,1071-5.
- Novella, I.S., Duarte, E.A., Elena, S.F., Moya, A., Domingo, E. & Holland, J.J. (1995a). Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **92**: 5841-5844.
- Novella, I.S., and Ebendick-Corpus, B.E. (2004). Molecular Basis of Fitness Loss and Fitness Recovery in Vesicular Stomatitis Virus. *J. Mol. Biol.* **342**, 1423–1430.
- Novella, I.S., Elena, S., Moya, A., Domingo, E. and Holland, J.J. (1995b). Size of Genetic Bottlenecks Leading to Virus Fitness Loss Is Determined by Mean Initial Population Fitness. *J. Virol.* **69(5)**: 2869–2872.
- Nowak, M. and Schuster, P. (1989). Error thresholds of replication in finite populations mutation frequencies and the onset of Müller’s ratchet. *J Theor Biol*, 137: 375-395.
- Orr, H.A. (2000). The rate of adaptation in asexuals. *Genetics* **155(2)**:961-8.
- Orr HA. (2003). The distribution of fitness effects among beneficial mutations. *Genetics* **163(4)**:1519-26.
- Paces, V., Dosekocil, J., and Sorm, F. (1968). Incorporation of 5-azacytidine into nucleic acids of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **161**:352-360.
- Paff, M.L., Stolte, S.P., and Bul, J.J. (2014). Lethal mutagenesis failure may augment viral adaptation. *Mol. Biol. Evol.* **31(1)**, 96–105.
- Page, T. & Connor, J.D. (1990). The metabolism of ribavirin in erythrocytes and nucleated cells. *Int. J. Biochem.* **22**:379-83.

- Pariante, N., Sierra, S., Lowenstein, P.R., and Domingo, E. (2001). Efficient virus extinction by combinations of a mutagen and antiviral inhibitors. *J. Virol.* **75**, 9723-30.
- Park, S.C. and Krug, J. (2007). Clonal interference in large populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:18135-18140.
- Paul, P. (1982). Mutagenesis and transformation of C3H/10T1/2 mouse embryo fibroblasts with ultraviolet light and 5-azacytidine. *Kobe J Med Sci.* **28**(5-6):181-96
- Petry, S., Brodersen, D.E., Murphy, F.V. 4th, Dunham, C.M., Selmer, M., Tarry, M.J., Kelley, A.C., and Ramakrishnan, V. (2005). Crystal structures of the ribosome in complex with release factors RF1 and RF2 bound to a cognate stop codon. *Cell.* **123**(7):1255-66.
- Petry, S., Weixlbaumer, A., and Ramakrishnan, V. (2008). The termination of translation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**(1):70-7.
- Perales, C., Henry, M., Domingo, E., Wain-Hobson, S., and Vartanian, J.P. (2011). Lethal mutagenesis of foot-and mouth disease virus involves shifts in sequence space. *J. Virol.* **85**(23), 12227–12240.
- Pfeiffer, J.K., and Kirkegaard, K. (2003). A single mutation in poliovirus RNA-dependent RNA polymerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increased fidelity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**(12), 7289–7294.
- Pfeiffer, J.K., and Kirkegaard, K. (2005). Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS Pathog.* **1**(2), e11.
- Phillips, P.C. (2008). Epistasis: the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nat. Rev. Genet.* **9**(11), 855–867.
- Piskala, A., and Sorm, F. (1964). Nucleic acids components and their analogues. Synthesis of 1glycosyl derivatives of 5-azauracil and 5-azacytosine. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **29**, 2060-2076.
- Poole, E.S., Brown, C.M., and Tate, W.P. (1995). The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of in vivo translational termination in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **14**(1):151-8.
- Raska, K.Jr., Jurovcik, M., Sormova, Z., and Sorm, F. On the Metabolism of 5-Azacytidine and 5-Aza-2'-Deoxycytidine in Mice. *Collection Czech. Chem. Commun.* **31**:3001-3005.
- Randerath, K., Tseng, W.C., Harris, J.S. and Lu, L.J. (1983). Specific effects of 5-fluoropyrimidines and 5-azapyrimidines on modification of the 5 position of pyrimidines, in particular the synthesis of 5-methyluracil and 5-methylcytosine in nucleic acids. *Recent Results Cancer Res.* **84**, 283-97.
- Ruiz-Jarabo, C.M., Ly, C., Domingo, E., and de la Torre, J.C. (2003). Lethal mutagenesis of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *Virology* **308**(1), 37-47.
- Rumnieks, J., and Tars, K. (2011). Crystal structure of the read-through domain from bacteriophage Q $\beta$  A1 protein. *Protein Sci.* **20**(10):1707-12.
- Rutman, R.J., Cantarow, A., and Paschkis, K.E. (1954). Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. I. The intracellular distribution of nucleic acids and protein in rat liver. *Cancer Res.* **14**:111-4.
- Sadeghipour, S., Bek, E.J., and McMinn, P.C. (2013). Ribavirin-resistant mutants of human Enterovirus 71 express a high replication fidelity phenotype during growth in cell culture. *J. Virol.* **87**(3), 1759–1769.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839):487-91.
- Salser, W. (1969). The influence of the reading context upon the suppression of nonsense codons. *Mol. Gen. Genet.* **105**:125-230.
- Sanjuán, R., Moya, A., and Elena, S.F. (2004). The contribution of epistasis to the architecture of fitness in an RNA virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**(43), 15376–15379.

- Sanjuán, R., Cuevas, J.M., Furió, V., Holmes, E.C., and Moya, A. (2007). Selection of robustness in mutagenized RNA viruses. *PLoS Genet.* **3**, e93.
- Sanjuán, R., Nebot, M.R., Chirico, N., Mansky, L.M., and Belshaw, R. (2010). Viral mutation rates. *J. Virol.* **84**(19):9733-48.
- Santi, D.V., & Hardy, L.W. (1987). Catalytic mechanism and inhibition of tRNA (uracil-5-)methyltransferase: evidence for covalent catalysis. *Biochemistry* **26**,8599-606.
- Santi, D.V., Norment, A., and Garrett, C.E. (1984). Covalent bond formation between a DNA cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:6993-6997.
- Santini, V. (2012). Novel therapeutic strategies: hypomethylating agents and beyond. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2012**:65-73.
- Schaefer, M., Pollex, T., Hanna, K., and Lyko, F. (2009). RNA cytosine methylation analysis by bisulfite sequencing. *Nucleic Acids Res.* **37**(2):e12.
- Scolnick, E., Tompkins, R., Caskey, T., and Nirenberg, M. (1968). Release factors differing in specificity for terminator codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **61**(2):768-74.
- Severson, W.E., Schmaljohn, C.S., Javadian, A., and Jonsson, C.B. (2003). Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication. *J. Virol.* **77**(1), 481–488.
- Sierra, M., Airaksinen, A., González-López, C., Agudo R., Arias A., and Domingo, E. (2007). Foot-and-Mouth Disease Virus Mutant with Decreased Sensitivity to Ribavirin: Implications for Error Catastrophe. *J. Virol.* **81**(4):2012-2024.
- Sierra, M., Lowenstein, P.R., and Domingo, E. (2000). Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis: influence of viral load and fitness in loss of infectivity. *J. Virol.* **74**(18), 8316-23.
- Skripkin, E.A., and Jacobson, A.B. (1993). A two-dimensional model at the nucleotide level for the central hairpin of coliphage Q beta RNA. *J. Mol. Biol.* **233**(2):245-60.
- Sniegowski, P.D. and Gerrish, P.J. (2010). Beneficial mutations and the dynamics of adaptation in asexual populations. *Phil. Trans. R. Soc. B* **365**:1255-1263.
- Sorm, F., Piskala, A., Cihak, A., and Vesely, J. (1964). 5-azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia* **20**:202-203.
- Springman, R., Keller, T., Molineaux, I.J., and Bull, J.J. (2010). Evolution at a high imposed mutation rate: adaptation obscures the load in phage T7. *Genetics* **184**, 221-232.
- Streeter, D.G., Witkowski, J.T., Khare, G.P., Sidwell, R.W., Bauer, R.J., Robins, R.K., and Simon, L.N. (1973). Mechanism of action of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**(4):1174-8.
- Stresemann, C., and Lyko, F. (2008). Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int. J. Cancer* **123**(1):8-13.
- Swetina, J. and Schuster, P. (1982). Self-replication with errors. A model for polynucleotide replication. *Biophys Chem*, **16**(4): 329-345.
- Takeshita, D., and Tomita, K. (2010). Assembly of Qβ viral RNA polymerase with host translational elongation factors EF-Tu and -Ts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**(36):15733-8.
- Tanaka, M.M., Bergstrom, C.T., and Levin, B.R. (2003). The evolution of mutator genes in bacterial populations: the roles of environmental change and timing. *Genetics* **164**:843–54.
- Tapia, N., Fernández, G., Parera, M., Gómez-Mariano, G., Clotet, B., Quinones-Mateu, M., Domingo, E., and Martínez, M.A. (2005). Combination of a mutagenic agent with a reverse transcriptase inhibitor results in systematic inhibition of HIV-1 infection. *Virology* **338**(1), 1-8.
- Taylor, S.M., Constantinides, P.A., and Jones, P.A. (1984). 5-Azacytidine, DNA methylation and differentiation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **108**:115-127.

- Taylor, S.M., and Jones, P.A. (1982). Mechanism of action of eukaryotic DNA methyltransferase. Use of 5-azacytosine-containing DNA. *J. Mol. Biol.* **162**(3):679-92.
- Toltzis, P., O'Connell, K., and Patterson, J.L. (1988). Effect of phosphorylated ribavirin on vesicular stomatitis virus transcription. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **32**(4):492-7.
- Torabi, N., and Kruglyak, L. (2011). Variants in SUP45 and TRM10 underlie natural variation in translation termination efficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* **7**(7):e1002211.
- Tsetsarkin, K.A., McGee, C.E., Volk, S.M., Vanlandingham, D.L., Weaver, S.C., and Higgs, S. (2009). Epistatic roles of E2 glycoprotein mutations in adaption of chikungunya virus to *Aedes albopictus* and *Ae. Aegypti* mosquitoes. *PLoS ONE* **4**(8), e6835.
- Tsukada, K., Okazaki, M., Kita, H., Inokuchi, Y., Urabe, I., and Yomo, T. (2009). Quantitative analysis of the bacteriophage Q $\beta$  infection cycle. *Biochimica et Biophysica Acta* **1790**,65–70.
- Turner, P.E., and Chao, L. (2003). Escape from Prisoner's Dilemma in RNA phage phi6. *Am Nat.* **161**(3):497-505.
- Urban, C., Zeffass, K., Fingerhut, C., and Beier, H. (1996). UGA suppression by tRNACmCATrp occurs in diverse virus RNAs due to a limited influence of the codon context. *Nucleic Acids Res.* **24**(17):3424-30.
- Van Duin, J. (1988). Single-Stranded RNA Bacteriophages. p. 117. In R. Calendar (ed.) *The Bacteriophages*. Plenum Press. New York.
- Van Duin, J.V., & Tsavera, N. (2006). Single-Stranded RNA phages en *The Bacteriophages* (Ed. Calendar, R.) *Oxford University Press*.
- Valle, R.P., and Morch, M.D. (1988). Stop making sense: or Regulation at the level of termination in eukaryotic protein synthesis. *FEBS Lett.* **235**(1-2):1-15.
- Vesely, J., Cihak, A., and Sorm, F. (1967). Biochemical mechanisms of drug resistance. IV. Development of resistance to 5-azacytidine and simultaneous depression of pyrimidine metabolism in leukemic mice. *Int. J. Cancer.* **2**(6):639-46.
- Vesely J, Cihak A, and Sorm F. (1968a). Biochemical mechanism of drug resistance. VII. Inhibition of orotic acid metabolism by 5-azacytidine in leukemic mice sensitive and resistant to 5-azacytidine. *Biochem.Pharmacol.* **17**(4):519-24.
- Vesely, J., Cihak, A., and Sorm, F. (1968b). Characteristics of mouse leukemic cells resistant to 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* **28**(10):1995-2000.
- Vesely, J., Cihak, A., and Sorm, F. (1970). Association of decreased uridine and deoxycytidine  $\phi$  kinase with enhanced RNA and DNA polymerase in mouse leukemic cells resistant to 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* **30**(8):2180-6.
- Viegas-Péquignot E, and Dutrillaux B. (1976). Segmentation of human chromosomes induced by 5-ACR (5-azacytidine). *Hum. Genet.* **34**(3):247-54.
- Vignuzzi, M., Stone, J.K., Arnold, J.J., Cameron, C.E., and Andino, R. (2006). Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439**(7074), 344–348.
- Vo, N.V., Young, K.C., and Lai, M.M.C. (2003). Mutagenic and inhibitory effect of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase. *Biochemistry* **42**(35):10462-71.
- Von Hoff, DD., and Slavik, M. (1977). 5-azacytidine—a new anticancer drug with significant activity in acute myeloblastic leukemia. *Adv. Pharmacol. Chemother.* **14**:285-326.
- Waddington, C.H. (1957). *The strategy of the genes; A discussion of some aspects of theoretical biology*. London: Allen and Unwin. 262 p
- Walderich, B., Ursinus-Wössner, A., van Duin, J., and Höltje, J.V. (1988). Induction of the autolytic system of *Escherichia coli* by specific insertion of bacteriophage MS2 lysis protein into the bacterial cell envelope. *J. Bacteriol.* **170**(11):5027-33.

- Webster, R.G. (1999). Antigenic variation in influenza viruses. In *Origin and Evolution of Viruses* (E. Domingo, R.G. Webster, and J.J. Holland, Eds.), pp. 377-390. Academic Press, San Diego.
- Webster, R.G., Laver, W.G., Air, G.M., and Schild, G.C. (1982). Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature* **296**(5853), 115-21.
- Weiner A.M., and Weber, K. (1971). Natural read-through at the UGA termination signal of the Q $\beta$  coat protein cistron. *Nature New Biol.* **234**:206-209.
- Weiss, J.W., and Pitot, H.C. (1974a). Inhibition of ribosomal ribonucleic acid maturation by 5-azacytidine and 8-azaguanine in Novikoff hepatoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **160**(1):119-29
- Weiss, J.W., and Pitot, H.C. (1974b). Alteration of ribosomal precursor RNA in Novikoff hepatoma cells by 5-azacytidine. Studies on methylation of 45S and 32S RNA. *Arch. Biochem. Biophys.* **165**(2):588-96.
- Weissmann, C. (1974). The making of a phage. *FEBS Lett.* **40**(0):S10-8.
- Weissmann, C., Billeter, M.A., Goodman, H.M., Hindley, J., and Weber, H. (1973). Structure and function of phage RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **42**,303–329.
- Wichman, H.A., Badgett, M.R., Scott, L.A., Boulianne, C.M., and Bull, J.J. (1999). Different trajectories of parallel evolution during viral adaptation. *Science* **285**(5426):422-4.
- Willis, R., Carson, D.A., and Seegmiller, J.E. (1978). Adenosine kinase initiates the major route of ribavirin activation in a cultured human cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3042-4.
- Wilke, C.O. (2004). The speed of adaptation in large asexual populations. *Genetics* **167**:2045-2053.
- Wilke, C.O. (2005). Quasispecies Theory in the context of population genetics. *BMC Evol. Biol.* **5**(44).
- Williams, G.C. (1992). Natural selection. Domains, levels and challenges. *Oxford University Press*, New York.
- Wimmer, E., Hellen, C.U., and Cao, X. (1993). Genetics of poliovirus. *Annu. Rev. Genet.* **27**:353-436.
- Winter, R.B., and Gold, L. (1983). Overproduction of bacteriophage Q beta maturation (A2) protein leads to cell lysis. *Cell* **33**(3):877-85.
- Wolf, J.B., Brodie, E.D. III and Wade, M.J. (2000). Epistasis and the Evolutionary Process. *Oxford University Press, Oxford/New York*.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Diver, W.P., Graham, M., Bateman, C., Baker, D.J., and Smith, S.S. (1988). RglB facilitated cloning of highly methylated eukaryotic DNA: the human L1 transposon, plant DNA, and DNA methylated in vitro with human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* **16**(10):4465-82.
- Wray, S.K., Gilbert, B.E., and Knight, V. (1985). Effect of ribavirin triphosphate on primer generation and elongation during influenza virus transcription in vitro. *Antiviral Res.* **5**(1):39-48.
- Yahata, H., Ocada, Y., and Tsugita, A. (1970). Adjacent effect on suppression efficiency. II. Study on ochre and amber mutants of T4 phage lysozyme. *Mol. Gen. Genet.* **106**:208-212.
- Zadrazil, S., Fucik, V., Bartl, P., Sormová, Z., and Sorm, F. (1965). The structure of DNA from *Escherichia coli* cultured in the presence of 5-azacytidine. *Biochim. Biophys. Acta* **108**(4):701-3.

**ANEXO**



## 9. ANEXO

**Tabla A.1. Mutaciones adicionales representadas a alta frecuencia en los clones biológicos aislados de las poblaciones Q $\beta$ Azc(60p60), Q $\beta$ Azc(80p70) y Q $\beta$ Azc(100p90).**

Población Q $\beta$ Azc	Clon <sup>1</sup>	Mutaciones
Q $\beta$ (60p60)	C1	U1583C U3020C
	C2	C1625U U2129C U3044C
	C3	C1625G U1652C U2213C
	C4	C1625G U2966C A3157G U3516C
	C5	A1778G A2508G U3011C U3170G U3212C A3566G
	C6	A1890G U1964C U2230C U2460C A2508G U2608C U2740C A2948G U3419C U3484C
	C7	U1796C U2061C U2509C U2776C A2915G U3056C C3455G U3899C
	C8	A2094C U2495C A3260G A3504C
	C9	U1628C U2009C U2426C U2467C U2776C U3008C A3504C
	C10	U2276G U2367A G2524A A2556G A2590G U3029C C3193G U3569C U3734C
Q $\beta$ (80p70)	C1	U2105C U2900C U3068C
	C2	C1517G U2123C U2951C U3038C U3287C U3314C
	C3	C1955G U2009C A2119G U2276G U3867C
	C4	U1601C C1625G U1703C U2105C A2160G C2210A U2276C U2425C U2495C U2558C U3011C C3158G C3233G
	C5	A1574G A1898G U2060C U2425C U2558C U2776C A2949G C3158G A3268G U3314C U3737C
	C6	U1628C A2657G A2943G U3122C U3356A U3755C U3761C A3824G
	C7	U1886C C1962G A2810C U3356C A3504C
	C8	A1890G U2291C U2509C U2777C U2954C G3994C
	C9	A1867G G2214A G2254U G2256U C2371U U2495C U3438G C3659U U3956C
	C10	U1796G U2016C A2412G U2509G U2776C U3020C C3455G C3879G
Q $\beta$ (100p90)	C1	A1827G A2293G U2477G U2510C U3212C C3344G U3590C
	C2	C1550U U2042C A2161G G3053A U3219C U3245G U3314C C3545A U3791C U3900C
	C3	U1505G U1965C A2422G U2459C U2684C A2810G A2831G A2984G C3074G U3101G U3788C
	C4	U2016C U2609C C2799G A2948U U3245C U3266G A3268G U3380C U3750C
	C5	A1957G U2936C U2966C C3205G C3302U
	C6	A1867G A1893G A2366G A2831G C3158A C3206U U3362C
	C7	A2119G A2773G U2825C A3179G U3473C U3755C
	C8	U1954C U3245C
	C9	G1826U U1934C A1956G C1962G A2010U U2291C U2459C U2663C U2785C A2810U U3056C U3314C U3359C U3419C U3788C A3813G U3878C U3902C
	C10	A2094G U2291C U2495C U2510C A2657G U2777C
	C11	U1505G U1811C U1964C U2099C U2105C U2420C U2425C C3158G A3941G
	C12	A1867G U1886C C1962G U1964C U2300C U2379C C3233G A3504C U3684C
	C13	U1583C U1682C U1721C U1811C U2213C C2919G U3431C A3506U
	C14	A1891G U2675C A2949G C3158G A3504C U3605C C3659U A3911G
	C15	U2129C U2813C U2972C U3412C

<sup>1</sup> Clones biológicos correspondientes a los mostrados en la tabla 5.7.